

附件9

《水质 急性毒性的测定 近头状尖胞藻
生长抑制试验（征求意见稿）》

编制说明

《水质 急性毒性的测定 近头状尖胞藻生长抑制试验》编制组

二〇二五年十二月

项目名称：水质 急性毒性的测定 近头状尖胞藻生长抑制试验

项目统一编号：1207.24

项目承担单位：浙江省生态环境监测中心、中国环境科学研究院、沈阳化工研究院、浙江省农业科学院

编制组主要成员：周胜利、余若祯、连纲、梁涛、孙晓慧、

吴声敢、杜丽娜、蔡磊明、杨海荣、晁爱敏

环境标准研究所技术管理负责人：雷晶

南京环境科学研究所技术管理负责人：王蕾

生态环境监测司项目负责人：仇鹏

目 次

1	项目背景	1
1.1	任务来源	1
1.2	工作过程	1
2	标准制订的依据和必要性	2
2.1	相关法律法规要求	2
2.2	制订本标准的必要性	3
3	国内外相关标准研究	5
3.1	主要国家、地区及国际组织相关分析方法	5
3.2	国内相关分析方法	7
3.3	标准名称和受试藻种定名、选择问题	8
3.4	与本标准的关系	10
4	标准制订的基本原则、技术路线和标准适用范围	14
4.1	标准制订的基本原则	14
4.2	标准制订的技术路线	14
4.3	标准的适用范围	16
5	标准的主要技术内容	16
5.1	规范性引用文件的选择	16
5.2	术语和定义	16
5.3	方法原理	18
5.4	藻类生长限制性因素及其处理情况	18
5.5	试剂和材料	23
5.6	仪器和设备	26
5.7	预培养	26
5.8	样品采集、保存和预处理	28
5.9	测试步骤	30
5.10	结果计算与表示	41
5.11	质量保证和质量控制	44
5.12	试验报告	45
5.13	附录	45
6	方法验证	46
6.1	实验室内验证	46
6.2	实验室间验证	49
7	与开题报告的差异说明	56
8	第一次征求意见稿技术审查会专家意见和修改情况	57
9	第二次征求意见稿技术审查会专家意见和修改情况	59
10	参考文献	60
	附件	63

《水质 急性毒性的测定 近头状尖胞藻生长抑制试验》

编制说明

1 项目背景

1.1 任务来源

2007年，原国家质量监督检验检疫总局下发《关于下达2007年第一批国家标准制修订项目经费的通知》（国质检财函〔2007〕971号），首次下达了《水质 用绿藻类栅藻属的 *subspicatus* 和月牙藻属的 *capricornutum* 做淡水藻类生长抑制试验》的编制任务，项目统一编号为1207.24，承担单位为广东出入境检验检疫局和原国家环境保护总局化学品登记中心。

2020年10月生态环境部法规与标准司和生态环境监测司组织2016年及以前立项国家环境保护标准结题论证会，并决定由浙江省生态环境监测中心承担该标准的制订工作，参加单位为中国环境科学研究院、沈阳化工研究院和浙江省农业科学院。

1.2 工作过程

1.2.1 成立标准编制组

接到任务后，浙江省生态环境监测中心、中国环境科学研究院、沈阳化工研究院和浙江省农业科学院立即成立标准编制组，并完成了任务书和合同书的填报。编制组多名成员具有扎实的水生态毒理学知识储备，以及丰富的标准制修订管理、藻类生长抑制试验和藻类监测实践经验。

1.2.2 查询国内外相关标准和文献资料

2020年10月~2021年11月，根据《国家生态环境标准制修订工作规则》（国环法规〔2020〕4号）的相关规定，编制组检索和收集了国内外相关标准和文献资料，对目前水环境管理需求以及藻类生长抑制试验方法的研究进展和存在的问题进行归纳总结。在整理借鉴的基础上，对方法主要内容进行了初步的研究和探讨，拟定了标准方法制订的基本原则和技术路线。

1.2.3 编写开题报告和标准草案

2021年12月~2025年3月，编制组根据拟定的技术路线，开展了样品的保存和预处理、生物量测定方法和方法条件试验等研究，并通过实验室内验证进一步确认了方法特性指标，并在此基础上编写了开题论证报告和标准草案。

1.2.4 召开标准开题论证会

2025年4月11日，由生态环境部生态环境监测司组织专家召开了线上开题论证会。专家委员会在听取了标准编制组的汇报后，经过质询和讨论，通过了本项目的开题论证，并提

出以下修改意见：

(1) 明确该试验用近头状尖胞藻（羊角月牙藻）作为受试生物，标准名称修改为《水质 急性毒性的测定 近头状尖胞藻生长抑制试验》，与即将发布的排放标准做好衔接，进一步完善说明；

(2) 完善相关术语定义，补充引用规范性文件；

(3) 比较说明各类毒性试验方法的特点，进一步说明制订该方法标准的必要性；

(4) 明确藻类生物量测定采用显微镜计数法；

(5) 进一步细化和规范标准文本。

会后，标准编制组根据意见进行了修改和完善。

1.2.5 第一次征求意见稿技术审查会

2025年10月16日，生态环境部生态环境监测司组织召开了第一次标准征求意见稿技术审查会，审查结论为不通过。同时，专家组提出以下意见：

1. 规范文本表述，调整部分条款顺序，完善样品采集和预处理过程、试样组制备、质量保证和质量控制等内容的文本表述，尽量做到准确、明确、具可操作性；

2. 明确 EC_{50} 计算方法，增加示例说明；

3. 根据标准文本修改情况相应修改完善编制说明；

4. 按照《环境监测分析方法标准制订技术导则》（HJ 168-2020）和《环境保护标准编制出版技术指南》（HJ 565-2010）对标准文本和编制说明进行编辑性修改。

会后编制组根据以上专家意见逐条修改完善，形成了修改后的标准征求意见稿及编制说明，修改情况说明见本编制说明第8节表33。

1.2.6 第二次征求意见稿技术审查会

2025年12月19日，生态环境部生态环境监测司组织召开了第二次标准征求意见稿技术审查会，审查结论为通过。同时，专家组提出以下意见：

1. 按照修改的标准文本（3.3和8.3.2.2）进一步补充完善编制说明；

2. 按照《环境监测分析方法标准制订技术导则》（HJ 168-2020）和《环境保护标准编制出版技术指南》（HJ 565-2010）对标准文本和编制说明进行编辑性修改。

会后编制组根据以上专家意见进行了修改和完善，形成了修改后的标准征求意见稿及编制说明，修改情况说明见本编制说明第9节表34。

2 标准制订的依据和必要性

2.1 相关法律法规要求

《中华人民共和国环境保护法》第十七条规定“国家建立、健全环境监测制度。国务院环境保护主管部门制定监测规范，会同有关部门组织监测网络，统一规划国家环境质量监测站（点）的设置，建立监测数据共享机制，加强对环境监测的管理”；第三十二条规定“国家加强对大气、水、土壤等的保护，建立和完善相应的调查、监测、评估和修复制度”。《中

《中华人民共和国水污染防治法》第二十五条规定“国家建立水环境质量监测和水污染物排放监测制度。国务院环境保护主管部门负责制定水环境监测规范,统一发布国家水环境状况信息,会同国务院水行政等部门组织监测网络,统一规划国家水环境质量监测站(点)的设置”。

因此,为贯彻《中华人民共和国环境保护法》《中华人民共和国水污染防治法》,防治生态环境污染,改善生态环境质量,规范水质毒性测定方法,根据《国家生态环境标准制修订工作规则》(国环法规〔2020〕4号)、《环境监测分析方法标准制订技术导则》(HJ 168-2020)^[1]和《环境保护标准编制出版技术指南》(HJ 565-2010)^[2]等文件的有关规定,开展水质毒性的藻类生长抑制试验标准制订。

2.2 制订本标准的必要性

2.2.1 复杂污染物复合环境风险识别需要

长期以来,我国水污染物排放控制主要依赖理化指标,对保护水生生物多样性、维护水生态安全和保障人民群众生命健康,发挥了重要作用。大量研究表明,现有污水处理工艺仍存在有毒有害物质去除不足的风险,经处理后的污水往往仍含有种类繁多的各类有毒有害物质,如 POPs、消毒副产物、塑化剂、抗生素和农药等^[3-6]。这些有毒有害物质尽管对综合排放指标 BOD、COD 和 TOC 等的贡献极小,且废水的理化指标上通常都能达到排放标准,但作为一个整体仍存在着生物毒性风险,因此仅利用污染物浓度指标判断水质是否安全存在着一定的局限性。生物毒性测试可以克服传统水质评价方法的不足,通过测定并量化所有已知和未知活性化学物质对特定终点的影响,从而解释综合效应并进行风险评价。欧洲合作项目 SOLUTIONS 建议开展最低限度的生物测定,包括藻类、溞类和鱼类胚胎的短期毒性试验,并辅以针对特定作用模式(MoA)的体外测定作为反映长期效应的替代方法^[7]。

2.2.2 对水生态初级生产者环境风险评估需要

在常见的水质毒性测试方法中,溞类试验、鱼类试验和发光细菌试验分别揭示了污染物对从初级消费者到分解者的毒性效应。而藻类生长抑制试验则通过藻类生物量的变化来反映水中有毒物质对植物生长的潜在影响,在数据有限的情况下,通常是唯一涉及初级生产者的测试,是监管生态毒理学的支柱之一。同时,针对不同致毒机制的污染物,上述受试生物的响应能力也各有差异。其中,溞类对呼吸与能量代谢抑制、神经毒性敏感,鱼类对神经毒性、器官损伤敏感,发光细菌对细胞膜破坏或酶活性抑制等代谢毒性敏感,而藻类则可以检测光合作用抑制、细胞分裂受阻等效应。如除草剂可显著抑制藻类生长,但对鱼类可能影响甚微。因此,研究制订藻类生长抑制试验方法标准,对于完整建立从生产者到分解者各营养级的生物毒性测试标准体系,全面评估污染物水生态安全风险具有十分重要的意义。

2.2.3 相关水污染物排放标准制修订的迫切需求

自 20 世纪 80 年代中期以来,发达国家在研究和应用排水综合毒性控制具有复杂组分尤其是有毒有机物的污水排放方面取得了巨大进展。如美国《清洁水法》第 302 部分以及国家污染物排放消除系统(NPDES)许可证制度规定,当基于技术的排放限值已不能满足当地水环境质量要求时,应采用更为严格的、基于水环境质量的排放限值,其中排水综合毒

性测试适用于废水水质复杂而较难提出特定污染物排放控制要求的情况。美国环保署将排水综合毒性测试（whole effluent toxicity test, WETT）技术与水质基准项目、水生态评价项目作为水质毒性控制战略的三大措施^[8,9]。其中，淡水毒性测定推荐使用的生物有鱼类、溞类和近头状尖胞藻（曾用名近头状伪蹄形藻 *Pseudokirchneriella subcapitata*、羊角月牙藻 *Selenastrum capricornutum*，见本编制说明第 3.3 节）。德国的水污染物排放标准则直接使用综合毒性指标，包括发光细菌、藻类、溞类和鱼卵毒性及致突变性，在明确测试终点的基础上，采用最低无效应稀释倍数（LID）来表征废水的综合毒性，简单明了，易于操作。我国最早于 2008 年在制药工业水污染物系列排放标准（GB 21903~GB 21908）中引入了综合毒性指标，规定了以 HgCl₂ 当量表示的废水发光细菌急性毒性排放限值（0.07 mg/L）^[10-15]。其后一段时期内，污废水的排放控制未再引入生物毒性指标。

近年来，在过去水质目标管理的基础上，水生态健康管理已发展成为我国水环境管理的重要内容，污废水的生物毒性减排更加受到重视。原环境保护部先后对《城镇污水处理厂污染物排放标准（征求意见稿）》（环办函〔2015〕1782 号）、《农药工业水污染物排放标准（征求意见稿）》（环办水体函〔2017〕194 号）公开征求意见，均引入了以发光细菌、藻类、溞类和鱼卵 LID 表示的较为全面的毒性控制限值，其中对羊角月牙藻的 LID 限值均为 16。2024 年，《农药工业水污染物排放标准》（GB 21523-2024）正式发布^[16]，其中第 4.1 条规定，新建企业自 2024 年 12 月 1 日起，现有企业自 2026 年 12 月 1 日起，执行表 1 和表 2 规定的水污染物排放限值。其中表 1 第 29 项为斑马鱼卵急性毒性（稀释倍数），适用于含原药生产的排污单位和农药工业污水集中处理设施，直接排放的 LID 限值为 6。2021 年，生态环境部发布《电子工业水污染物排放标准》（GB 39731-2020）^[17]，其中第 4.3 条规定，新建和现有电子工业污水集中处理设施运营单位自 2024 年 1 月 1 日起，在企业废水总排放口监测废水的斑马鱼卵急性毒性，排放水平参考值为 LID≤6。

当前我国现行水质毒性测试标准仅有《水质 急性毒性的测定 斑马鱼卵法》（HJ 1069-2019）^[18]和《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》（GB/T 15441-1995）等 2 项，缺乏其他适用的监测标准的实际情况，相关排放标准中拟定的藻类、溞类等控制项目暂未列入，制约了水污染物排放标准的制修订工作。

2.2.4 与国际标准接轨需要

国际上水质藻类生长抑制试验标准的制订工作开展较早，包括国际标准化组织（ISO）、经济合作与发展组织（OECD）、美国和欧盟等。如 ISO 早在 1989 年就已发布了第一版有关用淡水绿藻进行藻类生长抑制试验的标准，并于 2004 年和 2012 年先后作了修订。在我国，虽然有相关研究机构利用 ISO 方法开展污废水对藻类生长影响的研究，但一直没有与 ISO 接轨的标准方法。现有国家标准《化学品 藻类生长抑制试验》（GB/T 21805-2025）^[19]和《化学农药环境安全评价试验准则 第 14 部分：藻类生长抑制试验》（GB/T 31270.14-2025）^[20]为分别用于化学品和化学农药测试的标准方法，主要参照 OECD 化学品测试导则《Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test（淡水藻类和蓝藻生长抑制试验）》（OECD TG 201-2011 年）制订^[21]。与用于化学品测试的相关标准相比，水样测试在样品预

处理、样品稀释和测试终点等方面均有显著不同。因此，本标准的制订，对于我国开展水质藻类生长抑制试验，接轨国际标准具有极为重要的意义。

3 国内外相关标准研究

3.1 主要国家、地区及国际组织相关分析方法

目前，主要相关国际组织和发达国家均已发布了藻类生长抑制试验方法（见表1），并应用于化学品、水质的毒性测定。

表1 国外相关标准情况

序号	标准制订主体		标准名称	标准编号	发布时间
1	国际组织	国际标准化组织	Water quality— Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae(水质 单细胞淡水绿藻生长抑制试验)	ISO 8692 ^[22]	2012
2			Water quality— Guidelines for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waste water (水质 难溶性、挥发性化合物、金属以及废水藻类生长抑制试验)	ISO 14442 ^[23]	2006
3		国际经合组织	Guidelines for the testing of chemicals — Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test (化学品测试导则 淡水藻类和蓝藻生长抑制试验)	OECD TG 201	2011
4	美洲	美国	Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms (排水和受纳水对淡水生物慢性毒性的短期毒性试验方法)	EPA-821-R-02-013 ^[24]	2002
5			Standard guide for conducting static toxicity tests with microalgae (微藻静态毒性试验方法)	ASTM-E1218-04 ^[25]	2012
6		加拿大	Biological test method: growth inhibition test using a freshwater alga (生物学试验方法 使用淡水藻的生长抑制试验)	EPS 1/RM/25 ^[26]	2007
7	欧盟及成员国	欧盟	Water quality—Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae(水质 单细胞淡水绿藻生长抑制试验)	EN ISO 8692 ^[27]	2012
8		德国	Water quality—Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae(水质 单细胞淡水绿藻生长抑制试验)	DIN EN ISO 8692 ^[28]	2012
9			Determining the tolerance of green algae to the toxicity of waste water (测定绿藻对废水	DIN 38412-L-33 ^[29]	1991

序号	标准制订主体		标准名称	标准编号	发布时间
			毒性的耐受)		
10		法国	Water quality—Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae(水质 单细胞淡水绿藻生长抑制试验)	NF T90-304 ^[30]	2012
11	欧洲	英国	Water quality—Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae(水质 单细胞淡水绿藻生长抑制试验)	BS EN ISO 8692 ^[31]	2012
12		韩国	Water quality—Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae(水质 单细胞淡水绿藻生长抑制试验)	KS I ISO 8692 ^[32]	2014
13	亚洲	日本	Water quality—Fresh water algal growth inhibition test with <i>Scenedesmus subspicatus</i> and <i>Selenastrum capricornutum</i> (水质 用近具棘栅藻和羊角月牙藻进行淡水藻类生长抑制试验)	JIS K0420-73-10 ^[33]	2000
14	大洋洲	新西兰	Freshwater alga (<i>Selenastrum capricornutum</i>) chronic toxicity test protocol (淡水藻 (<i>Selenastrum capricornutum</i>) 慢性毒性试验规程)	Appendix to MFE 80205 ^[34]	1998

其中, ISO 标准 (ISO 8692-2012) 规定了 72 h ± 2 h 暴露周期 (生活污水和工业废水的快速生长抑制筛查可缩短至 48 h ± 2 h) 的藻类生长抑制试验方法, 受试生物为近头状伪蹄形藻 (*Pseudokirchneriella subcapitata*, 现称近头状尖胞藻 *Raphidocelis subcapitata*, 曾用名羊角月牙藻 *Selenastrum capricornutum*, 见本编制说明第 3.3 节, 下同) 和近具棘链带藻 (*Desmodesmus subspicatus*), 生物量测定可采用细胞密度法或其他非直接方法 (如使用分光光度计或荧光仪), 适用于水质物质和污废水的毒性测定。同时, ISO 另一标准 (ISO 14442-2006) 进一步对一些复杂样品的前处理和干扰消除作了规定。自 ISO 8692 标准颁布后, 欧盟及其成员国、亚洲韩国等也以此作为参照颁布了相应地区和国家标准, 内容和 ISO 标准一致, 如欧盟 (EN ISO 8692-2012)、英国 (BS EN ISO 8692-2012)、德国 (DIN EN ISO 8692-2012)、韩国 (KS I ISO 8692-2012) 等。

OECD 化学品测试导则 (OECD TG 201-2006) 规定了 72 h 暴露周期的藻类生长抑制试验方法, 受试生物为绿藻门的近头状伪蹄形藻 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) 和近具棘链带藻 (*Desmodesmus subspicatus*), 硅藻门的舟形藻 (*Navicula pelliculosa*), 蓝藻门的水华鱼腥藻 (*Anabaena flos-aquae*) 和聚球藻 (*Synechococcus leopoliensis*), 生物量测定可采用细胞密度法 (如显微镜计数法或电子颗粒计数法) 或其他替代测定手段 (如使用流式细胞仪、荧光仪或分光光度计)。该导则适用于化学品的毒性测定, 广泛应用于化学品的生态风险评估、登记和管理。

美国 EPA 方法 (EPA-821-R-02-013-2002) 规定了 96 h 暴露周期的藻类生长抑制试验方法, 受试生物为羊角月牙藻 (*Selenastrum capricornutum*), 生物量测定可采用细胞密度法

(如显微镜计数法或电子颗粒计数法)、叶绿素法或浊度法(分光光度法)。该方法适用于环境水样和污水的毒性测定,主要作为《清洁水法》中提出的用 WETT 方法从总量上控制有毒物质排放的配套分析方法。

美国材料协会方法 (ASTM-E1218-04-2012) 规定了 96 h (根据不同藻类的生长速度也可选择 72 h 或 120 h) 暴露周期的藻类生长抑制试验方法,受试生物为绿藻门的近头状伪蹄形藻 (*Pseudokirchneriella subcapitata*)、近具棘链带藻 (*Desmodesmus subspicatus*) 和小球藻 (*Chlorella vulgaris*),也允许选择其他藻类类群,如硅藻门的舟形藻 (*Navicula pelliculosa*),蓝藻门的铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 和水华鱼腥藻 (*Anabaena flos-aquae*),生长测定可采用显微细胞计数法、电子颗粒计数法、叶绿素法、ATP 法、碳 14 标记法、分光光度法和 DNA 含量法,适用于化学品及其制剂、商品、混合物的毒性测定。

日本工业标准 (JIS K0420-73-10-2000) 规定了 72 h±2 h 暴露周期的藻类生长抑制试验方法,受试生物为羊角月牙藻 (*Selenastrum capricornutum*) 和栅藻 (*Scenedesmus subspicatus*, 现称近具棘链带藻 *Desmodesmus subspicatus*),细胞生长的测定可采用细胞密度法和其他非直接方法(如荧光法和浊度法),该标准适用于化学品、水质物质和污水的毒性测定。

总体上,主要国家、地区及国际组织的藻类生长抑制试验分析方法大同小异,差异主要体现在受试生物、试验周期、培养条件、生物量测定方法和适用范围等方面。从发展趋势看,各标准的适用范围越来越明确,针对性更强。

3.2 国内相关分析方法

目前,我国具有相对较高认可度的藻类生长抑制试验方法有 4 项,包括《化学品 藻类生长抑制试验》(GB/T 21805-2025)^[19]和《化学农药环境安全评价试验准则 第 14 部分:藻类生长抑制试验》(GB/T 31270.14-2025)^[20]等 2 项国家标准,以及《化学品测试方法生物系统效应卷》(中国环境出版社,2013)中的 201“藻类生长抑制试验”^[35]和《水和废水监测分析方法(第四版增补版)》(中国环境出版社,2016)中的第三章第一部分“藻类生长抑制试验(B)”^[36]等 2 部出版物,见表 2。

表 2 国内藻类生长抑制试验相关试验方法

序号	发布部门/出版社	标准/方法名称	标准号	发布时间
1	国家质量监督检验检疫总局 国家标准化管理委员会	化学品 藻类生长抑制试验	GB/T 21805	2025
2	国家质量监督检验检疫总局 国家标准化管理委员会	化学农药环境安全评价试验准则 第 14 部分:藻类生长抑制试验	GB/T 31270.14	2025
3	中国环境出版社	化学品测试方法 生物系统效应卷 201 藻类生长抑制试验	/	2013

序号	发布部门/出版社	标准/方法名称	标准号	发布时间
4	中国环境出版社	水和废水监测分析方法 第三章 第一部分 藻类生长抑制 试验 (B)	/	2016

其中, GB/T 21805-2025 规定了 72 h 暴露周期的藻类生长抑制试验方法, 受试生物为绿藻门的近头状尖胞藻 (*Raphidocelis subcapitata*)、近具棘链带藻 (*Desmodesmus subspicatus*), 硅藻门的舟形藻 (*Navicula pelliculosa*), 蓝藻门的水华鱼腥藻 (*Anabaena flos-aquae*) 和聚球藻 (*Synechococcus leopoliensis*), 生物量测定可采用显微细胞计数法、直接光密度法 (可采用分光光度计或荧光仪) 以及叶绿素法 (提取叶绿素后, 使用分光光度计或荧光仪测定叶绿素含量), 标准适用于化学品的毒性测定。

GB/T 31270.14-2025 规定了 72 h 暴露周期的藻类生长抑制试验方法, 受试生物为绿藻门的近头状尖胞藻 (*Raphidocelis subcapitata*)、近具棘链带藻 (*Desmodesmus subspicatus*) 和小球藻 (*Chlorella vulgaris*), 生物量测定可采用显微细胞计数法、直接光密度法 (采用分光光度计)。该标准适用于化学农药的毒性测定, 主要为国内化学农药登记提供生态毒理学测试数据。

《化学品测试方法 生物系统效应卷》规定了 72 h 暴露周期的藻类生长抑制试验方法, 受试生物为绿藻门的羊角月芽藻 (使用拉丁名 *Pseudokirchneriella subcapitata*, “月牙”和“月芽”的使用见本编制说明第 3.3 节)、栅藻 (使用拉丁名 *Desmodesmus subspicatus*), 硅藻门的舟形藻 (*Navicula pelliculosa*), 蓝藻门的水华鱼腥藻 (*Anabaena flos-aquae*) 和聚球藻 (*Synechococcus leopoliensis*), 生物量测定可采用显微细胞计数法、电子颗粒计数法、直接光密度法 (可采用分光光度计或荧光仪) 以及叶绿素法 (提取叶绿素后, 使用分光光度计或荧光仪测定叶绿素含量)。该标准适用于化学品的毒性测定, 主要为国内新化学品登记提供生态毒理学测试数据。

《水和废水监测分析方法 (第四版增补版)》规定了 72 h 暴露周期的藻类生长抑制试验方法, 受试生物为绿藻门的羊角月芽藻 (*Selenastrum capricornutum*)、斜生栅藻 (*Scenedesmus oliquus*) 和普通小球藻 (*Chlorella vulgaris*), 生物量测定可采用显微细胞计数法、直接光密度法 (可采用分光光度计或荧光仪) 以及叶绿素法 (提取叶绿素后, 使用分光光度计或荧光仪测定叶绿素含量), 标准适用于化学品、环境水样和废水的毒性测定, 但针对环境水样和废水的样品前处理及干扰消除等方面均未有具体阐述。

3.3 标准名称和受试藻种定名、选择问题

原任务书标准名称《水质 用绿藻类栅藻属的 *Subspicatus* 和月牙藻属的 *Capricornutum* 做淡水藻类生长抑制试验》不符合标准命名规范, 且存在藻种中文名和拉丁名不符的错误。其中, 栅藻属的 *Subspicatus* 早期定名为近具棘栅藻 (*Scenedesmus subspicatus*), 归为栅藻属, 现定名为近具棘链带藻 (*Desmodesmus subspicatus*), 归为链带藻属。月牙藻属的 *Capricornutum* 是水生生物毒理学试验的模式生物, 早期定名为羊角月牙藻 (*Selenastrum capricornutum*), 后曾定名为近头状伪蹄形藻 (*Pseudokirchneriella subcapitata*), 目前又被明确归类为尖胞藻属, 定名为近头状尖胞藻 (*Raphidocelis subcapitata*)^[37-39], ISO 8692-2012

等标准均有说明。《化学品 藻类生长抑制试验》（GB/T 21805-2025）、《化学农药环境安全评价试验准则 第 14 部分：藻类生长抑制试验》（GB/T 31270.14-2025）、《农药登记环境影响试验生物试材培养 第 6 部分：近头状尖胞藻》（NY/T 4195.6-2022）的正文和中国科学院淡水藻种库等均已采用该定名。

《化学品 藻类生长抑制试验》（GB/T 21805-2025）附录 A 和《农药登记环境影响试验生物试材培养 第 6 部分：近头状尖胞藻》（NY/T 4195.6-2022）附录 A 中分别使用“羊角月芽藻”和“羊角月牙藻”。《现代汉语词典》中，“月牙儿”（月芽儿），新月。《辞海》中，“月牙”，亦作“月芽”。《辞海》中“月牙”有 27 条检索结果，“月芽”有 2 条检索结果。《现代汉语规范词典》明确将“月牙”列为标准词形，没有收录“月芽”。考虑使用习惯和规范性，本标准中使用名词“羊角月牙藻”。在引用 GB/T 21805-2025 内容时，尊重其原文，使用“羊角月芽藻”。

关于受试生物的选择，目前可用于生长抑制试验的淡水藻种较多，主要有绿藻门的近头状尖胞藻（*Raphidocelis subcapitata*）、近具棘链带藻（*Desmodesmus subspicatus*）和小球藻（*Chlorella vulgaris*），硅藻门的舟形藻（*Navicula pelliculosa*），蓝藻门的水华鱼腥藻（*Anabaena flos-aquae*）和聚球藻（*Synechococcus leopoliensis*）等。其中，近头状尖胞藻在国内外主要相关标准中均有作为受试生物，且使用也最为广泛，其次为近具棘链带藻和小球藻，其他藻种则使用相对较少。上述各藻种对有毒物质的敏感性也不同，如 ISO 8692-2012 在其条款 5.1 受试生物中强调“近头状尖胞藻和近具棘链带藻对有毒物质的反应并不一致”。ISO 标准提供的实验室内比对结果显示，重铬酸钾和 3,5-二氯苯酚对两种藻的 72 h EC₅₀ 均值分别存在 1.42 和 1.90 倍差异。由于敏感性不同，使用不同藻种将造成排水毒性监管尺度的不统一。

另外，近头状尖胞藻普遍呈单细胞状态，而近具棘链带藻则常出现几个细胞并联的现象（见图 1）。在细胞计数便捷性和计数结果准确性方面，近头状尖胞藻均显著优于近具棘链带藻。

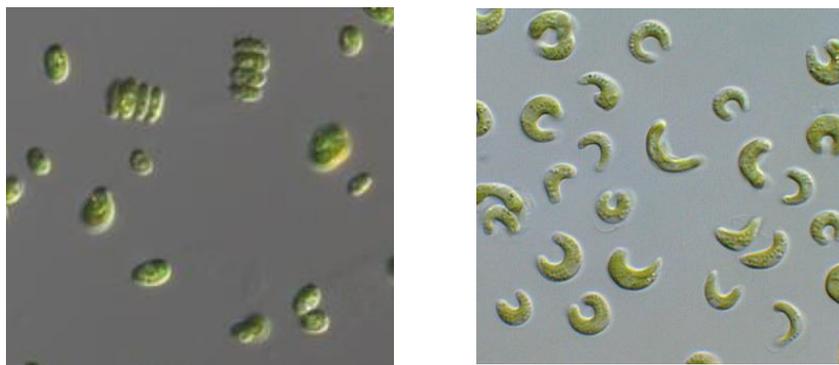


图 1 近具棘链带藻（左图）和近头状尖胞藻（右图）

因此，作为美国国家污染物排放削减许可证（NPDES）制度的配套监测方法，EPA-821-R-02-013-2002 直接明确了方法受试生物为近头状尖胞藻。加拿大、德国、英国、

新西兰、东北大西洋公约组织国家、波罗的海沿岸国家也在排放废水的藻类生长抑制试验中普遍使用近头状尖胞藻作为受试藻种。

3.4 与本标准的关系

本标准主要作为将来水污染物排放标准的配套使用，如毒性测定结果存在显著差异，将导致达标判定的执法尺度不统一。鉴于目前主要国家在排放废水的藻类生长抑制试验中普遍使用近头状尖胞藻（*Raphidocelis subcapitata*）作为受试藻种，结合开题论证专家委员会意见，本标准明确以近头状尖胞藻（*Raphidocelis subcapitata*）为受试生物，标准名称则按照三段式命名规则改为《水质 急性毒性的测定 近头状尖胞藻生长抑制试验》。

鉴于 ISO 8692-2012 和 OECD TG 201-2006 是国内外最为广泛采用的分别用于测定水质和化学品藻类毒性的试验方法，本标准以 ISO 8692-2012 为主要编制依据，部分内容也参考了 OECD TG 201-2006、EPA-821-R-02-013-2002 和 GB/T 21805-2025 等标准，与上述标准的关系和比较见表 3。

表3 与国内外相关试验方法主要技术指标比较

指标	ISO 8692-2012	EPA-821-R-02-013-2002	OECD TG 201-2006	GB/T 21805-2025	本标准
适用范围	水和废水中单一物质或混合物	污废水、环境水样	化学品	化学品	地表水、地下水、生活污水和工业废水
受试生物	近头状尖胞藻、近具棘链带藻	近头状尖胞藻	近头状尖胞藻、近具棘链带藻、舟形藻、水华鱼腥藻、聚球藻	近头状尖胞藻、近具棘链带藻、舟形藻、水华鱼腥藻、聚球藻	近头状尖胞藻 (参照 EPA-821-R-02-013)
	初始细胞密度不超过 10^4 cells/mL	推荐初始细胞密度 1×10^4 cells/mL	近头状尖胞藻初始细胞密度 $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4$ cells/mL	近头状尖胞藻初始细胞密度 $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4$ cells/mL	初始细胞密度 $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ cells/mL
培养基	ISO 培养基(等同于 OECD TG 201 培养基)	AAP 培养基	OECD TG 201 培养基或 AAP 培养基	OECD TG 201 培养基或 AAP 培养基	ISO 培养基 (参照 ISO 8692)
参比物质	3,5-二氯苯酚或重铬酸钾	氯化镉	3,5-二氯苯酚或重铬酸钾	3,5-二氯苯酚或重铬酸钾	3,5-二氯苯酚 (重铬酸钾为一类致癌物,且为管制试剂)
样品采集	聚乙烯、聚丙烯或聚四氟乙烯材质采样瓶,满瓶采样 (引用 ISO 5667-16)	使用 4 升(1 加仑)聚乙烯采样袋,满瓶采样	/	/	按照 HJ 91.2、HJ 164、HJ 91.1 的规定,使用聚乙烯、聚丙烯或聚四氟乙烯材质采样瓶/袋,满瓶采样 (采样容器材质参照 ISO 5667-16)
样品运输与保存	2 °C~8 °C 避光运输和保存,不超过 48 h;需长期保存,则尽快于 ≤ -18 °C 保存,保存期不超过 2 个月 (引用 ISO 5667-16)	0 °C~6 °C 运输和保存,不超过 36 h,特殊许可下不超过 72 h	/	/	2 °C~8 °C 避光运输和保存,并在 48 h 内开展试验;否则应在 24 h 内运回实验室并尽快混匀分装后 ≤ -18 °C 保存,保存期不超过 60 d (参照 ISO 5667-16)

指标	ISO 8692-2012	EPA-821-R-02-013-2002	OECD TG 201-2006	GB/T 21805-2025	本标准
样品预处理 (样品解冻)	冷冻保存的样品，不超过 25 °C 水浴解冻，或 2 °C ~ 8 °C 冷藏过夜解冻 (引用 ISO 5667-16)	/	/	/	冷冻保存的样品，不超过 25 °C 水浴解冻，或 2 °C ~ 8 °C 避光冷藏过夜解冻 (参照 ISO 5667-16)
样品预处理 (悬浮物去除)	可待样品粗颗粒物沉降 30 min~2 h 后，取上清液用于试验，如有必要，可进一步采取离心措施（如 4500 g±1500 g 的转速离心 10min） (引用 ISO 14442、ISO 5667-16)	可用粗滤器或 2~4 mm 孔径尼龙筛网过滤悬浮物、杂物或大型漂浮物。环境水样应经 0.45 μm 孔径滤膜过滤	/	/	目视有悬浮物的地下水、生活污水和工业废水经沉降 30 min~2 h 后，取上清液；如仍可见有悬浮物，进一步以 4500 g±1500 g 离心 10 min；地表水样品经 0.45 μm 孔径滤膜过滤 (参照 ISO 14442、ISO 5667-16、EPA-821-R-02-013)
样品预处理 (pH 调节)	通常不调节	通常不调节	/	/	通常不调节 (参照 ISO 8692)
样品预处理 (营养盐添加)	向样品中添加与培养基等量的营养盐	/	/	/	向样品中添加与培养基等量的营养盐 (参照 ISO 8692)
试验用水	去离子水或纯度相当的水（电导率 < 10 μS/cm）	去离子水	去离子水	去离子水或蒸馏水	去离子水或蒸馏水（电导率 < 10 μS/cm） (参照 ISO 8692)
样品稀释	测试 LID 时，按 1.25、2、3、4、6、8、12..... 倍的稀释系列逐级稀释；测试 ErC _x 时，按系数不大于 3.2 的等比间隔稀释	按系数不大于 2 的等比间隔稀释	至少 5 个浓度组，按系数不大于 3.2 的等比间隔稀释	至少 5 个浓度组，按系数不大于 3.2 的等比间隔进行稀释	测试 LID 时，按 1、2、3、4、6、8、12..... 倍的稀释系列逐级稀释；测试 EC ₅₀ 时，至少 5 个浓度组，按系数不大于 3.2 的等比间隔稀释

指标	ISO 8692-2012	EPA-821-R-02-013-2002	OECD TG 201-2006	GB/T 21805-2025	本标准
					(参照 ISO 8692、HJ 1069-2019、OECD TG 201)
试验周期	72 h±2 h	96 h	72 h	72 h	72 h±2 h (参照 ISO 8692)
培养温度	21 °C~25 °C	25 °C±1 °C	21 °C~24 °C	21 °C~24 °C	21 °C~25 °C (参照 ISO 8692)
培养光强	60 μmol/(m ² ·s) ~ 120 μmol/(m ² ·s)或 6000 lx~10000 lx, 培养区域光强差异保持在±10%以内	86 μE/(m ² ·s) ±8.6 μE/(m ² ·s)、400 ft-c ±40 ft-c	60 μE/(m ² ·s)~120 μE/(m ² ·s)或 4440 lx~8880 lx, 培养区域光强差异保持在±15%以内	60 μE/(m ² ·s)~120 μE/(m ² ·s)或 4440 lx~8880 lx, 培养区域光强差异保持在±15%以内	6000 lx~10000 lx, 培养区域光强差异保持在±10%以内 (参照 ISO 8692)
细胞悬浮方法	机械持续摇转或搅拌	机械持续摇转或人工摇动	机械持续摇转或搅拌	机械持续摇转或搅拌	机械持续摇转或人工摇动 (参照 EPA-821-R-02-013、ASTM-E1218-04)
生物量测定	细胞密度法或其他非直接方法	细胞密度法或其他非直接方法	细胞密度法或其他非直接方法	细胞密度法或其他非直接方法	细胞密度法
测试终点	LID、ErCx	EC ₅₀ 、LOEC、NOEC	ErCx、EyC _x 、LOEC、NOEC	ErCx、EyC _x 、LOEC、NOEC	LID、EC ₅₀
质量保证和质量控制	对照组平均比生长率至少为 1.4 d ⁻¹ ; 对照组各平行间的比生长率变异系数应≤5%; 对照组 pH 值升高不应超过 1.5 个单位	对照组中平均细胞密度至少达到 1×10 ⁶ cells/mL; 对照组各平行间的细胞密度变异系数应≤20%	对照组平均比生长率至少为 0.92 d ⁻¹ ; 整个试验阶段, 对照组各平行间的比生长率变异系数应≤7%; 试验各阶段, 对照组比生长率变异系数的均值应≤35%; 对照组 pH 值升高不应超过 1.5 个单位	对照组平均比生长率至少为 0.92 d ⁻¹ ; 整个试验阶段, 对照组各平行间的比生长率变异系数应≤7%; 试验各阶段, 对照组比生长率变异系数的均值应≤35%; 对照组 pH 值升高不应超过 1.5 个单位	对照组平均比生长率至少为 1.4 d ⁻¹ ; 整个试验阶段, 对照组各平行间的比生长率变异系数应≤5%; 试验各阶段, 对照组比生长率变异系数的均值应≤35%; 对照组 pH 值升高≤1.5 个单位 (参照 ISO 8692、OECD TG 201)

4 标准制订的基本原则、技术路线和标准适用范围

4.1 标准制订的基本原则

本标准根据《环境监测分析方法标准制订技术导则》（HJ 168-2020）和《环境保护标准编制出版技术指南》（HJ 565-2010）要求，以国内外最新的标准方法和相关文献研究成果为编制基础。同时考虑到国内现有监测机构的技术水平、管理水平、经济条件等实际情况，确保所编制的标准能够在全国范围内推广应用。标准制订过程中主要遵循以下原则：

- 1) 结合国内外水质毒性管理政策现状和发展趋势，满足我国相关生态环境管理工作要求，配套生活污水、工业废水排放标准的制修订需求；
- 2) 方法准确可靠，本标准以 ISO 8692-2012 标准为主要编制依据，同时借鉴 OECD TG 201-2006、EPA-821-R-02-013-2002 和 GB/T 21805-2025 等标准或导则方法，研究验证试验条件参数，使方法各性能指标满足环境监测技术和管理的要求；
- 3) 方法具有普遍适用性，易于推广使用。

4.2 标准制订的技术路线

标准制订的技术路线见图 2。

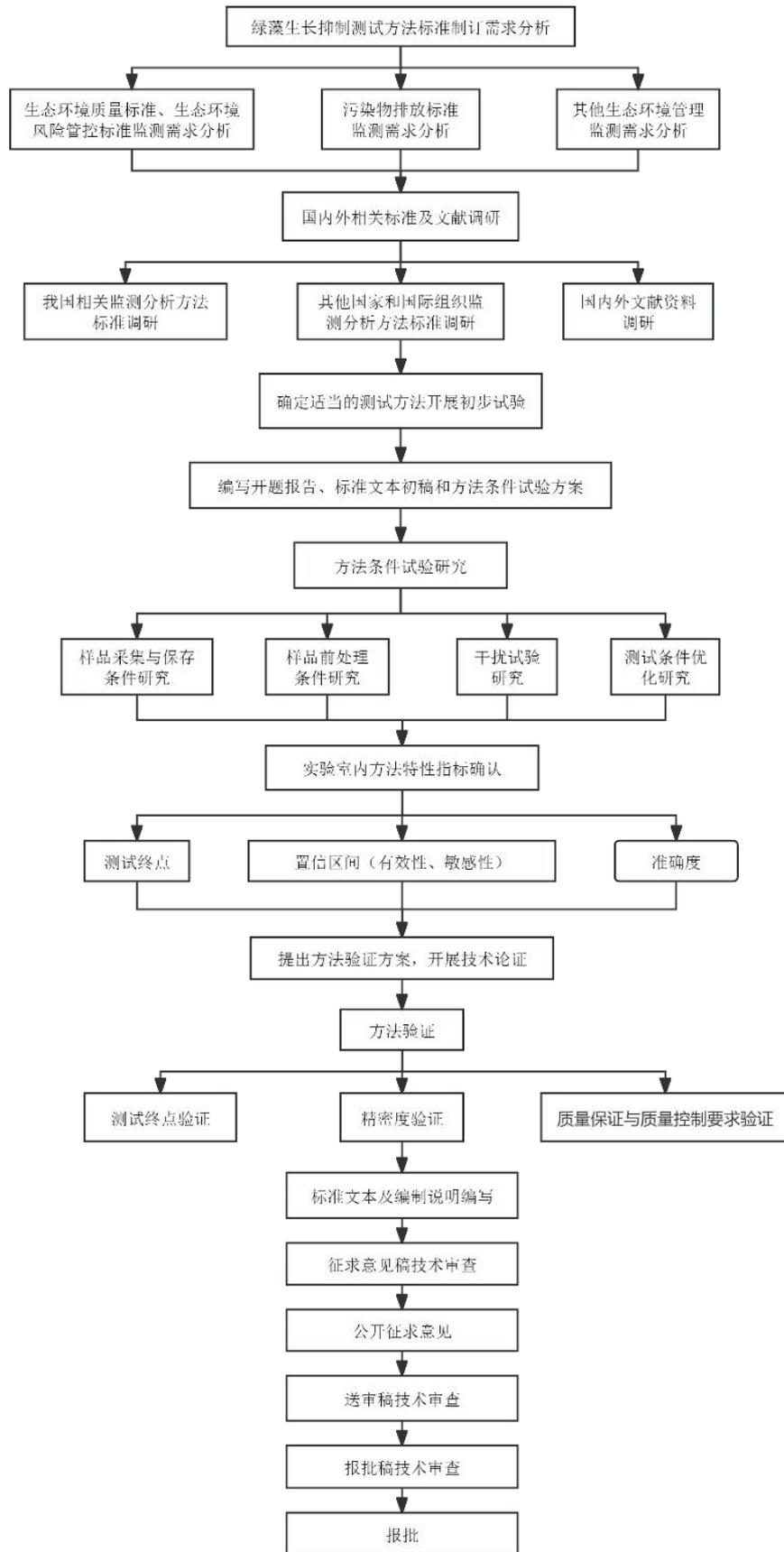


图 2 标准制订技术路线图

4.3 标准的适用范围

本标准测定的是水质对淡水藻类的生长抑制毒性，测试目标非单一物质，测定结果以最低无效应稀释度（LID）和效应浓度 EC₅₀ 来表征受试样品对藻类的生长抑制作用。

近头状尖胞藻（*Raphidocelis subcapitata*）是国际标准化组织（ISO）、国际经济合作组织（OECD）、美国、加拿大、新西兰、德国、日本等国际组织和国家水生态毒理学试验的模式生物，代表水体中的生产者，我国化学品和农药领域的国家标准或行业标准也主要采用近头状尖胞藻作为受试生物。本标准明确以近头状尖胞藻为受试生物。

本标准适用于地表水、地下水、生活污水和工业废水的淡水藻类综合毒性测定。对于含盐废水，如果受纳水体为淡水，废水中的溶解盐属于污染物，需要使用淡水生物测定包括溶解盐在内的污染物产生的毒性，因此本方法适用。

藻类为单细胞物种，对渗透压（盐度）的影响比较敏感。如果受纳水体为海水或咸水，应使用海水物种或咸水物种。美国环保署、英国环境署和澳大利亚联邦政府气候变化、能源、环境与水资源部均有专门的海洋藻类生长抑制试验方法。

5 标准的主要技术内容

5.1 规范性引用文件的选择

为满足生态环境监测需求和方法测试要求，本标准引用了我国水样采集、保存和水质参数测定等现行相关标准，在标准条款 2 规范性引用文件中予以规定。

5.2 术语和定义

细胞密度、比生长率、指数生长、试样、最低无效应稀释倍数、半数效应浓度和参比物是藻类生长抑制试验中表征水质毒性的重要术语，主要参照 ISO 8692-2012、HJ 1069-2019 和《化学物质环境管理 化学物质测试术语》（HJ 1257-2022）^[40]的相关定义。

5.2.1 细胞密度 cell density

ISO 8692-2012 对细胞密度的定义为“单位体积液体中的细胞数量”，并在其注中规定了细胞密度以每毫升细胞数表示。本标准细胞密度参照该定义。

5.2.2 比生长率 specific growth rate (μ)

ISO 8692-2012 中的定义为“单位时间内细胞密度的增长比例速率”，并用以下公式计算：

$$\mu = \frac{1}{n} \cdot \frac{dn}{dt}$$

式中： μ ——比生长率，d⁻¹；

n ——细胞密度，cells/mL；

t ——时间，d。

HJ 1257-2022 中比生长率的定义为“测试期间，生物量自然对数值在单位时间内的变化率”。

本标准明确以藻细胞密度作为生物量的测定参数，因此参考 HJ 1257-2022，将比生长率定义为：测试期间，藻细胞密度自然对数值在单位时间内的变化率，以 d^{-1} 表示。

5.2.3 指数生长 exponential growth

《微生物学名词》中，指数生长（exponential growth）的定义为：在微生物培养过程中，细胞数量呈几何级数增长的状态。

《动物学名词》中，指数增长（exponential growth）的定义为：在食物和空间等条件充裕、气候适宜、没有敌害等理想条件下，种群的增长率不变，数量会连续增长，即呈几何级数增长。大致呈现 J 形曲线。

《植物学名词》中，指数增长（exponential growth）的定义为：假定在一个有充足必需品的封闭环境中，满足如下方程的种群增长： $dN/dt = \lambda N_t$ 。式中 N 为种群大小， λ 为常数， t 为时间。也称几何增长（geometric growth）、马尔萨斯增长（Malthusian growth）。

以上表明指数生长指在环境条件适宜、无外界胁迫的理想条件下，生物总群以几何级数增长的状态。本标准将指数生长定义为：在理想条件下，藻细胞数量以几何级数增长的状态。

5.2.4 试样 test solution

参照 HJ 168-2020 关于试样的术语定义“由实验室样品制备并从中抽取试料的样品”，并根据本标准内容明确其定义，即“样品经培养基稀释配成的可供测试的溶液”。

5.2.5 最低无效应稀释倍数 lowest ineffective dilution (LID)

ISO 8692-2012 对最低无效应稀释倍数的定义为“与对照相比，无抑制作用或效应不超过试验特定变异性的稀释水平”，并在条款 10 结果表示中规定“当通过分级稀释测试废水时，观察到抑制小于 5% 的最高浓度试验介质被称为最低无效稀释倍数（LID）”。本标准参照该术语定义。

5.2.6 半数效应浓度 median effective concentration (EC₅₀)

HJ 1257-2022 中半数效应浓度（median effect concentration, EC₅₀）的定义为“在给定测试周期内，导致 50% 受试生物出现某观察效应的受试物浓度”。本标准参照该术语定义。

全国科学技术名词审定委员会审定的名词如下：

《麻醉学名词》中，半数效应浓度（median effective concentration）的定义为：能引起 50% 最大效应的药物浓度。符号为 EC₅₀。

《海洋科技名词》中，半数效应浓度（median effective concentration, EC₅₀）的定义为：化学物质在毒性实验中能引起 50% 海洋生物产生某种效应的浓度值。

美国环保署在 Thesaurus of Terms Used in Microbial Risk Assessment 中将 effective concentration 定义为：一组受试生物预期会引起 50% 效应的浓度，缩写 EC₅₀。

ISO 8692 中 effective concentration 定义为：与空白对照组相比，测量到 x% 效应的试样浓度（EC_x）。

注：为了明确表示来源于生长速率的 EC 值，建议使用符号“ErC”。

本标准采用 HJ 1257 的定义，英文名称采用全国科学技术名词审定委员会审定的名词“median effective concentration”。

5.2.7 参比（毒）物 reference toxicants

HJ 1257-2022 对参比（毒）物的术语定义为“在测试中为证实或否定受试物的某种特性或判断测试系统有效性而使用的化学物质，具有一定的毒性、稳定性和分析方法。可用于不同实验室之间，同一实验室内部不同时间或不同人员之间测定结果的可比性评价”。本标准参照该术语定义。

5.3 方法原理

ISO 8692-2012 对方法原理的表述为：

单一种类的绿藻细胞株在含有一定浓度测试样品的培养介质中培养多个世代，该培养介质由适量的生长培养基、测试样品和处于指数生长期的绿藻细胞接种物混合而成。培养 72 h ± 2 h，至少每隔 24 h 测定一次每个试验容器中的藻细胞密度。抑制是指在相同条件下，比生长率相对于对照组的降低。

本标准方法原理参照该表述。

5.4 藻类生长限制性因素及其处理情况

5.4.1 藻类生长的限制性因素

光是藻类生长的基本能源。样品颜色和悬浮物具有遮光效应，是藻类生长抑制试验的重要限制性因素。针对样品颜色和悬浮物，ISO 14442-2006 在其条款 9 中作了具体阐述：

光照强度变化引起的生长率变化取决于藻类培养的光照强度是否处于饱和强度水平，在饱和水平以上，光强度的变化不会改变生长率，在饱和值以下，光强度和生长率之间基本呈线性关系（如果没有其他因素限制生长），国际标准推荐的每种藻类的光饱和强度都不同，目前尚不完全清楚。然而，标准推荐的光强下限一般低于饱和值。因此，有色和浑浊（水）样品以及有色物质和材料可能会通过遮光或过滤掉藻类培养所需的特定光波长而对藻类生长产生负面影响。

另外，样品的 pH 值可能超出受试藻类的耐受限度，样品的营养盐不足可导致受试藻类不能保持指数生长，以及环境水样自身携带的另一类悬浮物藻类因对受试藻种的营养竞争和增殖后遮光效应，也是试验中的限制性因素。

5.4.2 样品前处理的基本要求

在生物综合毒性测试中，对样品的前处理通常要求尽可能保持样品的原始特征，但如果样品中的限制性因素干扰测试则建议进行消除。

如《水质—采样—第 16 部分：生物测试样品指南》（ISO 5667-16-2017）^[4]条款 7.5 对样品悬浮物的前处理就作了如下规定：

通常，生物测试使用原始样品。但是，在某些情况下，大量的颗粒物、污泥和沉积物会干扰测试生物的行为需求（例如，堵塞鱼鳃、影响溞类滤食、限制藻类的光照）。如果测试结果不希望反映这些不利影响，可以通过多种方法排除这些干扰。

基于类似逻辑，该指南条款 7.7 规定样品的 pH 处理如下：

样品 pH 值调节的目标值取决于测试目的和测试生物的生理需求……如果试验结果要反映 pH 值的影响，或者调节 pH 值时观察到物理变化或化学反应（例如沉淀），则应省略中和步骤。

5.4.3 悬浮物

作为 ISO 8692-2012 相关内容的引用文件，ISO 5667-16-2017 和 ISO 14442-2006 对于悬浮物的去除方法均有相应规定，其中 ISO 5667-16-2017 条款 7.5 规定：

如果测试结果不希望反映这些（悬浮物）不利影响，可以通过多种方法避免或消除这些干扰……需要考虑与过滤有关的问题（例如过滤材料的吸附和浸出）。沉淀和离心可以避免这些问题。一般而言，离心（如 4500 g ± 1500 g 离心 10 min）比过滤更可取……含颗粒物水样进行生物试验时，建议样品沉降 30 分钟至 2 小时。

ISO 14442-2006 条款 8 中也同样规定：

最好待粗颗粒物经一段时间沉降后测试完整样品。如果需要进一步去除颗粒物，最好采用离心法，而不是过滤法。

编制组也开展了离心对水样悬浮物去除效果的验证。将用于水族过滤吸附的陶瓷环在球磨仪下充分研磨成粉末，制成水浊液后静置 24 h，取最上层浊液进一步用培养基配制成 25 NTU 的样品，分别以 1500 g、4500 g、7500 g、10500 g 和 13500 g 离心后取上清液，再次测定浊度，结果表明离心对悬浮物具有较好的去除效果（见图 3）。

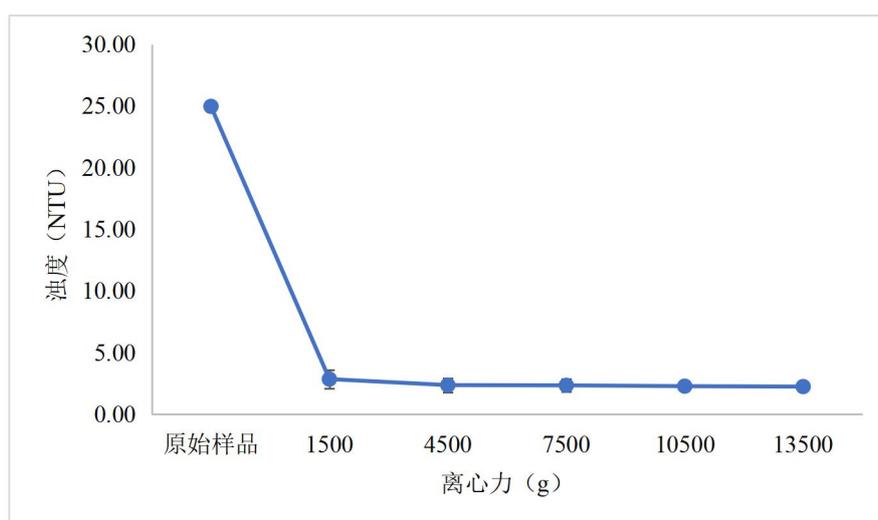


图 3 不同离心力对悬浮物的去除效果

而对于地表水样品，因往往含有藻类而有其特殊性，ISO 相关标准均无特别规定，而 EPA-821-R-02-013 条款 8.8.2 则规定：

用于近头状尖胞藻毒性测试的受纳水，使用前必须经孔径 $0.45\ \mu\text{m}$ 的滤膜过滤。可用粗滤器或 $2\ \text{mm}\sim 4\ \text{mm}$ 孔径尼龙筛网过滤悬浮物、杂物或大型漂浮物。

针对地表水样品中的藻类，编制组也开展了离心对去藻效果的验证。取某地表水样品测定初始叶绿素浓度，分别以 $1500\ \text{g}$ 、 $4500\ \text{g}$ 、 $7500\ \text{g}$ 、 $10500\ \text{g}$ 和 $13500\ \text{g}$ 离心后取上清液，再次测定叶绿素浓度。结果表明，在 $1500\ \text{g}$ 及以上离心力下可以去除样品中的绝大部分藻类，离心力在 $4500\ \text{g}$ 以上时除藻效果趋于稳定，但均不能完全去除（见图 4）。

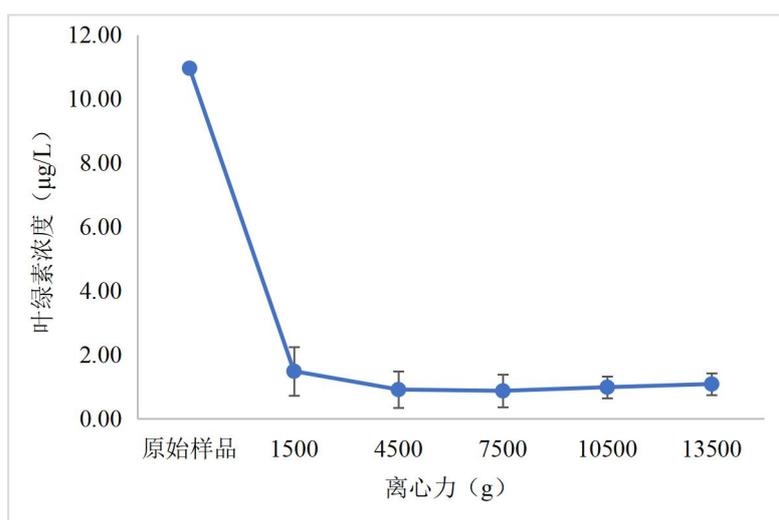


图 4 不同离心力对藻类的去除效果

鉴于以上标准规定并根据验证结果，本标准规定了样品悬浮物去除的静置、离心和过滤方法，以及方法的选择条件。即目视存在悬浮物的生活污水、工业废水和地下水样品自然沉降 $30\ \text{min}\sim 2\ \text{h}$ ，取上清液用于下一步测试。如经 $2\ \text{h}$ 自然沉降后，样品中仍可见有悬浮物时，应将样品加入离心管，放入低速冷冻离心机以 $4500\ \text{g}\pm 1500\ \text{g}$ 离心 $10\ \text{min}$ ，取上清液用于下一步测试。尽管离心可以去除地表水样品中的绝大部分藻类颗粒，但残存的藻细胞因在测试培养过程中对受试藻种形成营养竞争且增殖后产生遮光效应等问题，本标准规定地表水样品应通过 $0.45\ \mu\text{m}$ 孔径的滤膜过滤以消除本身所携带藻类的影响。

5.4.4 pH 值

一方面调节样品 pH 值可能会改变样品性状而引起毒性的变化，另一方面极端酸碱会对生物造成胁迫，也是生物综合毒性的测试目标。ISO 8692-2012 条款 7.4 规定：

- (1) 通常，加入待测样品后，试验应在不调节 pH 值的情况下进行。
- (2) 但是一些物质可能由于极端酸性或碱性而产生毒性效应。为了确定样品的毒性与 pH 值无关，可使用 $1\ \text{mol/L}$ 的盐酸或 $1\ \text{mol/L}$ 氢氧化钠将样品或储备液（在系列稀释前）的 pH 值调节至培养基的 pH 值 (8.1 ± 0.2)。

本标准样品 pH 值调节参照 ISO 标准的上述规定。

5.4.5 营养盐

营养盐是藻类生长的基础。培养基中的营养盐浓度对供应受试藻种的生长是过剩的，但水样中的营养盐浓度往往并不是。因此国内外相关标准大多规定了测试前需往样品中添加营养盐。ISO 14442-2006 对样品营养盐的添加量和添加原因有着较为具体的表述，在其条款 8 中规定：

在用培养基进一步稀释之前，向未稀释样品中添加与对照生长培养基等量的营养盐储备液。通过这种方式，使所有试验液都能获得相同浓度的添加营养盐，从而在试验期间实现藻类最佳生长，排除样品营养盐含量对生长的影响。

本标准条款 8.3.4 营养盐的添加参照了上述规定，即参照标准文本附录 A 培养基的配制方法，向每 987 mL 样品中分别加入 10 mL 储备液 1、1 mL 储备液 2、1 mL 储备液 3 和 1 mL 储备液 4。

5.4.6 颜色

通常情况下，溶解性物质是水样颜色的主要来源，因此过滤或离心对样品颜色的去除效果较为有限，但样品颜色对测试的影响仍可以通过其他方式进行消除。ISO 14442-2006 在其条款 9 中作了具体阐述：

实践经验表明，在根据国际标准设计的连续振动测试系统中，显著的遮光效应主要在几乎不透明的有色溶液或悬浊液中观察到，因为连续摇动可确保所有藻类细胞在测试期间的一部分时间内暴露在全光照强度下。为了进一步减少遮光对受试藻类生长率的可能影响，在测试非常不透明或浑浊的样品时，可将培养箱中的光强度增加至确保在最高浓度的有色和/或浑浊测试介质下达到光饱和强度的水平，结合减少试验介质层的厚度……通过在光源和培养基之间插入滤光片来校正着色效果可能会导致错误的结果，因此不推荐使用。

编制组验证了样品颜色在不同摇动方式下对藻类生长的影响。使用对藻类无毒的活性艳蓝 KN-R (CAS: 2580-78-1) 作为色素体，用培养基分别配制成色度为 8 倍、30 倍、80 倍、300 倍和 800 倍的样品，用于模拟不同样品色深（见图 5）。然后分别以 6000 lx、8000 lx 和 10000 lx 为培养光强，其余试验条件和试验过程均按标准要求，开展样品颜色的遮光效应验证。结果表明，在标准规定的摇动频率（100 r/min ± 10 r/min）下，只有在样品色度 ≥ 300 倍时，遮光效应才会发生（见图 6）。其中 300 倍也是我国现行排放标准中色度排放的最高限值。而在人工定时摇动（早晚各 1 次）下，样品色度为 8 倍时即可产生轻微的遮光效应，且遮光效应与培养光强呈负相关，样品颜色越深遮光效应越明显（见图 7）。

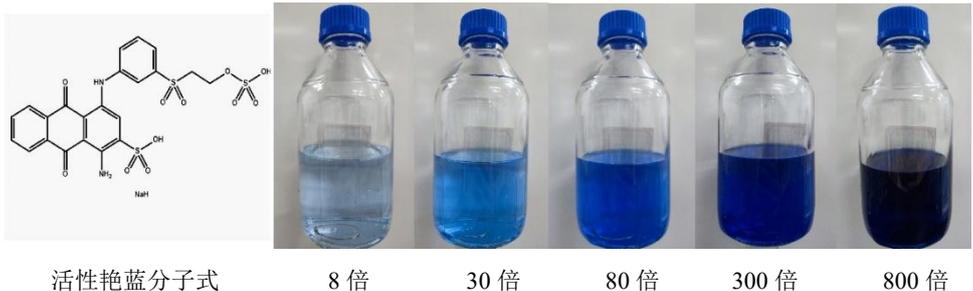


图5 活性艳蓝分子式及各浓度色度

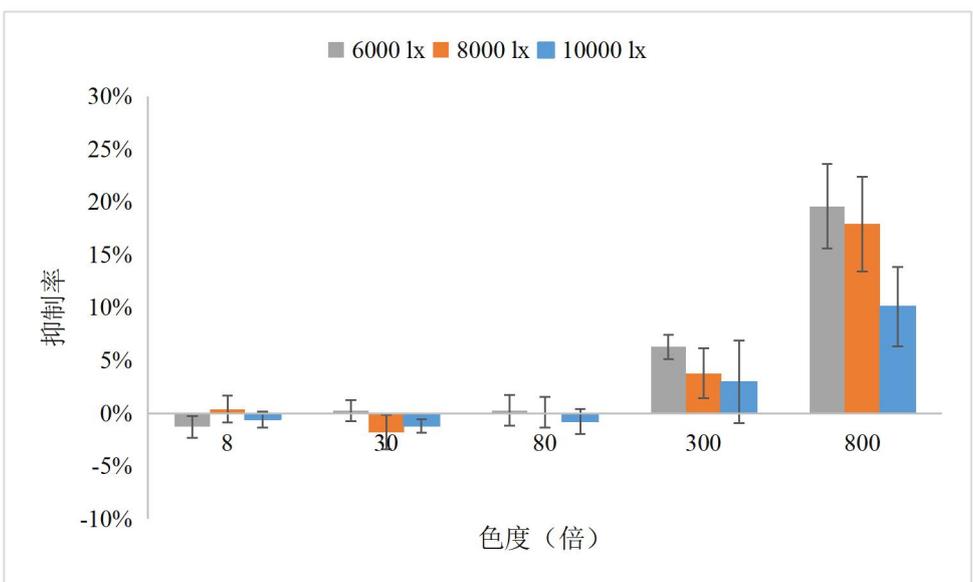


图6 持续机械摇动下不同样品色度对藻类生长的遮光效应

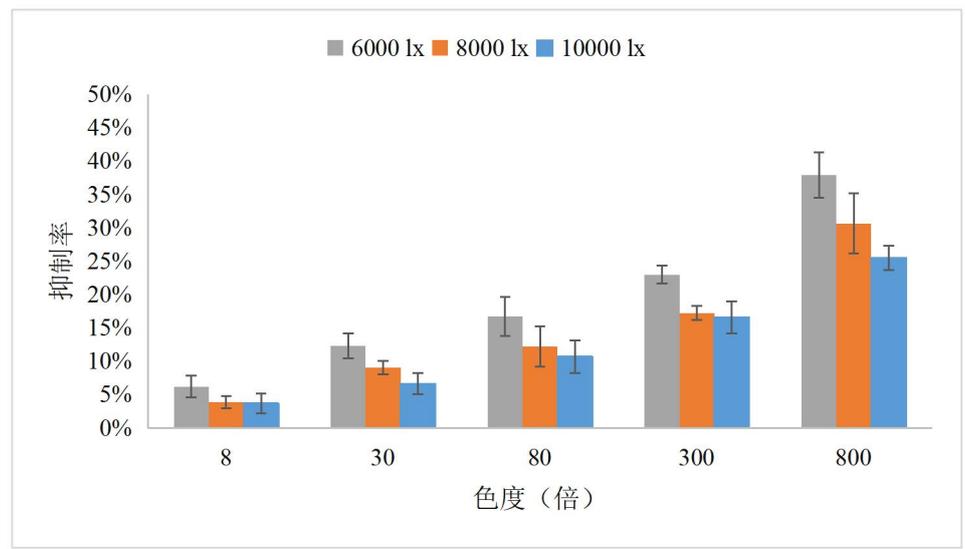


图7 人工定时摇动下不同样品色度对藻类生长的遮光效应

结合国际标准的相关规定和编制组的研究，本标准在测试培养章节规定，测试有色样品时应使用摇床并在 100 r/min±10 r/min 下持续摇转培养。

5.5 试剂和材料

5.5.1 试剂

5.5.1.1 一般试剂和材料

除非另有说明，试验均使用符合国家标准分析纯试剂。实验用水为新制备的纯水（去离子水或蒸馏水），电导率 $<10\ \mu\text{S}/\text{cm}$ ，制水装置管路应避免使用铜质材料。

5.5.1.1.1 盐酸（HCl）： $\rho=1.18\ \text{g}/\text{mL}$ ， $w\in[36.0\%, 38.0\%]$ 。

5.5.1.1.2 氢氧化钠（NaOH）。

5.5.1.1.3 3,5-二氯苯酚（ $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2\text{O}$ ）。

5.5.1.1.4 盐酸溶液： $c(\text{HCl})=1.0\ \text{mol}/\text{L}$ 。

移取 8.3 mL 盐酸，用纯水定容至 100 mL。

5.5.1.1.5 氢氧化钠溶液： $c(\text{NaOH})=1.0\ \text{mol}/\text{L}$ 。

称取 4 g 氢氧化钠，溶于少量纯水中，用纯水定容至 100 mL。

5.5.1.2 培养基的选择

培养基中的营养盐是藻类生长的基础，目前主流的培养基配方是 ISO/OECD 培养基（ISO 和 OECD 培养基中的营养盐成分及其浓度相同），此外还有 US EPA 使用的培养基。培养基组分见表 4。两组培养基的大部分组分和含量基本相似，其中存在差别的有：

- a) ISO/OECD 培养基和 US EPA 培养基分别采用氯化铵和硝酸钠作为氮源，其中氮元素的摩尔数分别为 0.280 mM 和 0.300 mM，均为过量的常量元素；
- b) ISO/OECD 培养基和 US EPA 培养基氯化钙的浓度相差较大，分别为 0.122 mM 和 0.03 mM，ISO 和 OECD 培养基的硬度稍高于 US EPA 培养基；
- c) ISO/OECD 培养基和 US EPA 培养基缓冲体系存在差异，分别使用磷酸二氢钾和碳酸氢钠，磷酸氢二钾和碳酸氢钠；
- d) US EPA 培养基含剧毒物硒酸钠；
- e) ISO/OECD 培养基和 US EPA 培养基培养基的 pH 值存在差异，分别为 8.1 和 7.5。

主要是因为 US EPA 方法测试时间持续 96 h，ISO/OECD 方法测试时间持续 72 h。

表 4 培养基组分比较表

储备液	营养成分	ISO	OECD	US EPA
1: 常量元素	NaNO_3	/	/	25.5 mg/L (0.300 mM)
	NH_4Cl	15 mg/L (N: 3.9 mg/L)	15.0 mg/L (0.280 mM)	/
	$\text{MgCl}_2 \cdot 6(\text{H}_2\text{O})$	12 mg/L (Mg: 2.9 mg/L)	12.0 mg/L (0.0590 mM)	12.16 mg/L (0.0598 mM)

储备液	营养成分	ISO	OECD	US EPA
	CaCl ₂ · 2(H ₂ O)	18 mg/L (Ca: 4.9 mg/L)	18.0 mg/L (0.122 mM)	4.41 mg/L (0.0300 mM)
	MgSO ₄ · 7(H ₂ O)	15 mg/L (S: 1.95 mg/L)	15.0 mg/L (0.0609 mM)	14.6 mg/L (0.0592 mM)
	K ₂ HPO ₄	/	/	1.044 mg/L (0.00599 mM)
	KH ₂ PO ₄	1.6 mg/L (P: 0.36 mg/L)	1.60 mg/L (0.00919 mM)	/
2: Fe-EDTA	FeCl ₃ · 6(H ₂ O)	64 µg/L (Fe: 13 µg/l)	0.0640 mg/L (0.000237 mM)	0.160 mg/L (0.000591 mM)
	Na ₂ EDTA · 2(H ₂ O)	100 µg/L	0.100 mg/L (0.000269 ^b mM)	0.300 mg/L (0.000806 mM)
3: 微量元素	H ₃ BO ₃ ^a	185 µg/L (B: 32 µg/l)	0.185 mg/L (0.00299 mM)	0.186 mg/L (0.00300 mM)
	MnCl ₂ · 4(H ₂ O)	415 µg/L (Mn: 115 µg/l)	0.415 mg/L (0.00210)	0.415 mg/L (0.00201)
	ZnCl ₂	3 µg/L (Zn: 1.4 µg/l)	0.00300 mg/L (0.0000220 mM)	0.00327 mg/L (0.000024 mM)
	CoCl ₂ · 6(H ₂ O)	1.5 µg/L (Co: 0.37 µg/l)	0.00150 mg/L (0.00000630 mM)	0.00143 mg/L (0.000006 mM)
	Na ₂ MoO ₄ · 2(H ₂ O)	7 µg/L (Mo: 2.8 µg/l)	0.00700 mg/L (0.0000289 mM)	0.00726 mg/L (0.000030 mM)
	CuCl ₂ · 2(H ₂ O)	0.01 µg/L (Cu: 3.7 ng/l)	0.00001 mg/L (0.00000006 mM)	0.000012 mg/L (0.00000007 mM)
	Na ₂ SeO ₄	/	/	0.00239 mg/L
4: NaHCO ₃	NaHCO ₃	50 mg/L (C: 7.14 mg/L)	50.0 mg/L (0.595 mM)	15.0 mg/L (0.179 mM)
/	pH	8.1 ± 0.2	8.1	7.5 ± 0.1
^a H ₃ BO ₃ 可以加入 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液助溶。 ^b EDTA 与 Fe 的摩尔比, 略超 1:1, 这样可以防止铁沉淀, 同时最大限度降低重金属离子的螯合作用。				

ISO 制定标准时, 根据试验研究对 EPA 培养基做出了修改和完善。因 US EPA 培养基含剧毒物硒酸钠 (Na₂SeO₄), 从购买试剂和实验室安全管理的便利性角度考虑, 本标准不考虑采用 US EPA 培养基。目前, ISO/OECD 培养基是国际上应用最为广泛的淡水绿藻生长抑制试验培养基, 在我国化学品和农药环境管理等领域, 检测机构经过数十年的普遍使用, 已建立起成熟的测试体系。因此, 本标准采用 ISO/OECD 培养基。

5.5.1.3 培养基的试剂

根据 5.5.1.2 节确定的培养基组分, 所需试剂标准文本在附录 A 中列举如下。

5.5.1.3.1 氯化锌 (ZnCl₂)。

5.5.1.3.2 氯化钴 (CoCl₂ · 6H₂O)。

- 5.5.1.3.3 氯化铜 ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。
- 5.5.1.3.4 钼酸钠 ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。
- 5.5.1.3.5 氯化铵 (NH_4Cl)。
- 5.5.1.3.6 氯化镁 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)。
- 5.5.1.3.7 氯化钙 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。
- 5.5.1.3.8 硫酸镁 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)。
- 5.5.1.3.9 磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)。
- 5.5.1.3.10 氯化铁 ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)。
- 5.5.1.3.11 乙二胺四乙酸二钠 ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。
- 5.5.1.3.12 硼酸 (H_3BO_3)。
- 5.5.1.3.13 氯化锰 ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)。
- 5.5.1.3.14 碳酸氢钠 (NaHCO_3)。

5.5.1.4 储备液和培养基的配制

本标准条款 5.1 中的各类试剂的准备及储备液和培养基的配制参照了 ISO 8692-2012 的相关规定（见表 5）。

表 5 贮备液和培养基中营养物的质量浓度

储备液	营养成分	储备液中的浓度	培养基中的终浓度
储备液 1: 常量元素	氯化铵 (NH_4Cl)	1.5 g/L	15 mg/L (N: 3.9 mg/L)
	氯化镁 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	1.2 g/L	12 mg/L (Mg: 2.9 mg/L)
	氯化钙 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1.8 g/L	18 mg/L (Ca: 4.9 mg/L)
	硫酸镁 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1.5 g/L	15 mg/L (S: 1.95 mg/L)
	磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)	0.16 g/L	1.6 mg/L (P: 0.36 mg/L)
储备液 2: Fe-EDTA	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	64 mg/L	64 $\mu\text{g/L}$ (Fe: 13 $\mu\text{g/L}$)
	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100 mg/L	100 $\mu\text{g/L}$
储备液 3: 微量元素	硼酸 (H_3BO_3)	185 mg/L	185 $\mu\text{g/L}$ (B: 32 $\mu\text{g/L}$)
	氯化锰 ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	415 mg/L	415 $\mu\text{g/L}$ (Mn: 115 $\mu\text{g/L}$)
	氯化锌 (ZnCl_2)	3 mg/L	3 $\mu\text{g/L}$ (Zn: 1.4 $\mu\text{g/L}$)
	氯化钴 ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	1.5 mg/L	1.5 $\mu\text{g/L}$ (Co: 0.37 $\mu\text{g/L}$)
	氯化铜 ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.01 mg/L	0.01 $\mu\text{g/L}$ (Cu: 3.7 ng/L)
	钼酸钠 ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	7 mg/L	7 $\mu\text{g/L}$ (Mo: 2.8 $\mu\text{g/L}$)
储备液 4: 碳酸氢钠	碳酸氢钠 (NaHCO_3)	50 g/L	50 mg/L (C: 7.14 mg/L)

注: H_3BO_3 可以加入 0.1 mol/L NaOH 助溶。

5.5.2 受试生物

参照本编制说明第 3.3 节和第 3.4 节, 本标准条款 5.2 明确以近头状尖胞藻为受试生物, 并注明其曾用名和拉丁名。

5.6 仪器和设备

- 5.6.1 采样器：玻璃或不锈钢材质。
- 5.6.2 粗滤网：不锈钢或尼龙材质，孔径 2 mm~4 mm（10 目~5 目）。
- 5.6.3 采样瓶/袋：聚乙烯、聚丙烯或聚四氟乙烯材质，容积 \geq 4 L。
- 5.6.4 pH 计：测量范围 0~14，最小分度为 0.01 pH 单位。
- 5.6.5 便携式冷藏箱：具有 2 °C~8 °C 冷藏功能。
- 5.6.6 分装瓶/袋：聚乙烯、聚丙烯或聚四氟乙烯材质，容积 \geq 1 L。
- 5.6.7 恒温水浴箱：水浴温度在 0 °C~25 °C 范围内可调。
- 5.6.8 无菌操作台或无菌操作室。
- 5.6.9 三角瓶：广口，玻璃材质，250 mL 规格，配透气封口膜或硅胶塞。
注：同一次试验应使用同一批次的三角瓶和透气封口膜或硅胶塞。
- 5.6.10 光照培养箱或培养室：内部空气温度在 20 °C~25 °C 范围内可调，控温精度、温度波动和温度均匀度均在 \pm 1 °C 以内，配有冷白光荧光照明，符合测试培养（9.5.1）和贮备培养（B.2）的照度要求，可连续工作。
- 5.6.11 光照度计：4 π 或 2 π 球面光照度计，测量范围 6000 lx~10000 lx，示值误差不超过 1 lx。
- 5.6.12 冰箱：具有 0 °C~8 °C 冷藏和-18 °C 及以下冷冻功能。
- 5.6.13 低速冷冻离心机：0 °C~8 °C 内温度可控、温度波动在 \pm 1 °C 以内，离心力在 1000 g~8000 g 内可调，配 50 mL~500 mL 离心管支架和聚丙烯材质离心管。
- 5.6.14 微量移液器：量程范围 10 μ L~100 μ L，配 100 μ L 无菌吸头。
- 5.6.15 计数框：血球计数板或 0.1 mL 浮游植物计数框，配面积为 22 mm \times 22 mm、厚度小于 0.2 mm 盖玻片。
- 5.6.16 摇床：转速 80 r/min~120 r/min，可调。
- 5.6.17 生物显微镜：正置或倒置，物镜 4 \times 、10 \times 、20 \times 、40 \times ，目镜 10 \times 或 15 \times 。
- 5.6.18 电子天平：分度值 0.1 mg。
- 5.6.19 高压蒸汽灭菌器：在 100 kPa 时，温度可达 121 °C 及以上。
- 5.6.20 真空过滤装置：可高压蒸汽灭菌。也可使用市售一次性无菌针筒式过滤器。
- 5.6.21 温度计：测量范围 0 °C~50 °C，最小分度为 0.1 °C。
- 5.6.22 无菌离心管：聚乙烯、聚丙烯或聚四氟乙烯材质，容量 50 mL~500 mL。
- 5.6.23 滤膜 I：孔径 0.45 μ m，玻璃纤维、醋酸纤维或硝酸纤维材质。
- 5.6.24 滤膜 II：孔径 0.22 μ m，玻璃纤维、醋酸纤维或硝酸纤维材质，可高压蒸汽灭菌。
- 5.6.25 实验室常用玻璃器皿：与试样直接接触的器皿应为玻璃或其他化学惰性材质。

5.7 预培养

预培养使藻种适应试验环境条件，并可为测试提供足够的处于指数生长状态的接种藻种。ISO 8692-2012 条款 7.2 规定“应在试验开始前 2 d~4 d 预培养藻细胞悬液，在培养基中以足够低的细胞密度接种（例如，进行 3 d 预培养时，细胞密度为 5×10^3 cells/mL 至 10^4 cells/mL），以便在试验开始前保持指数增长。预培养条件应与试验条件相同”。

在测试过程中应将所有三角瓶置于统一的培养温度和光照条件下。关于试验的具体温度和光照条件，ISO 8692-2012条款7.6规定“将试验容器置于 $23\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，持续白色光照下培养，使用适当的照度计在 $400\text{ nm}\sim 700\text{ nm}$ 的光合作用有效波长范围内测量时，测定介质处的平均光照强度应在 $60\text{ }\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})\sim 120\text{ }\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 之间……以lx表征的照度计，试验允许使用 $6000\text{ lx}\sim 10000\text{ lx}$ 的等效光强”。

为保证藻细胞生长速率以及指数生长期持续时间，并结合实际，藻类生长抑制试验通常对温度和光照都规定了一个范围，特别是光照的范围往往较宽。因为必要时，为保证培养基的pH值不会发生显著变化，可能还需在规定范围内适当降低培养温度。而严格要求高光照度会给所用培养箱的适当温度控制带来问题。

本标准测试培养的光照和温度条件，以及培养时间均参照了ISO标准。

在测试培养过程中，为使藻细胞保持均匀悬浮状态以及 CO_2 从空气到试验液的传递，还需采取人工方式或机械方式摇动三角瓶。如ISO 8692-2012条款7.6规定“培养容器应持续摇晃、搅拌或给培养物通气”。ASTM-E1218-04-2012则在其条款11.5中规定“通过持续以每分钟 100 ± 10 次振荡频率摇晃，或定期手动摇晃”。EPA-821-R-02-013-2002也在其条款14.10.3.1中规定“试验烧瓶……需在机械摇床上以每分钟100次的频率持续振荡，或每天手动摇动两次”。

由于搅拌和通气对培养装置的要求较为复杂，且还可能对试验带来一些不确定影响，因此目前广泛采用人工定时和机械的方式摇动三角瓶。编制组对这两种摇动方式的藻类生长开展了验证。结果表明，在本标准规定的测试培养温度和光照条件下，机械摇动方式（ $100\text{ r}/\text{min}\pm 10\text{ r}/\text{min}$ ）的藻类比生长率略高于人工定时摇动（早晚各1次），但均能达到标准规定的藻类比生长率大于 1.4 d^{-1} 的质控要求（见图8）。而无论采取哪种摇动方式，藻类比生长率与培养温度均存在明显的正相关关系，光照强度变化则对藻类比生长率的影响较小。

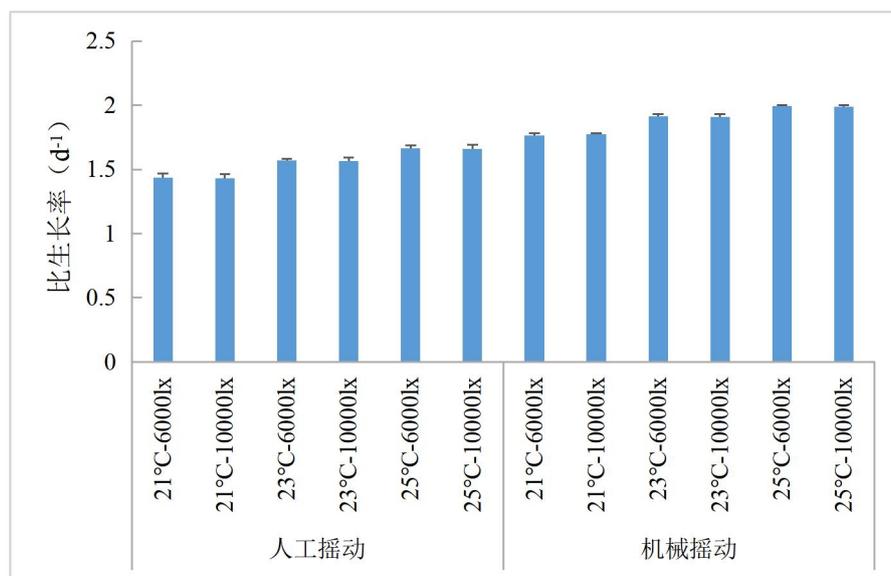


图8 两种摇动方式下不同温光组合对近头状尖胞藻比生长率的影响

根据上述标准及实验室验证结果,自动和手工摇动的空白对照组比生长率均能达到质控要求,本标准确定 LID 和 EC₅₀ 的抑制率均是通过比较对照后获得,不受摇动方式的影响,且二种摇动方式在 EPA 和 ASTM 等国际标准中均被采用。因此,本标准允许采用人工定时和机械的方式摇动三角瓶,其中机械摇动方式则给出与 ASTM-E1218-04-2012 规定相同的速度。

5.8 样品采集、保存和预处理

5.8.1 样品采集

地表水、地下水、生活污水和工业废水样品的采样频次、采样时间以及采样位置分别按照《地表水环境监测技术规范》(HJ 91.2-2022)^[42]、《地下水环境监测技术规范》(HJ 164-2020)^[43]、《污水监测技术规范》(HJ 91.1-2019)^[44]相关章节执行。上述标准规定地表水和地下水一般采集瞬时样品。生活污水和工业废水根据水质的稳定性,采集瞬时样品或者混合样品。连续排放的生活污水和工业废水采集混合样品时,每 6 h 采集 1 份样品,24 h 内采集 4 份等体积的样品混合为 1 个样品。间歇排放的生活污水和工业废水采集混合样品时,每个排放周期中间采集 1 份样品,24 h 内采集若干份等体积的样品混合为 1 个样品。

采集和保存样品的容器是影响样品完整性的重要因素,应充分考虑以下几个方面:1)最大限度地防止容器及瓶塞对样品的污染;2)容器壁应易于清洗、处理;3)容器或容器塞的化学和生物性质应该是惰性的,以防止容器与样品组分发生反应;4)防止容器吸收或吸附待测组分,引起待测组分浓度的变化。ISO 5667-16-2017 在其条款 6.2.2 中规定“样品容器应耐加热、耐冷冻和耐高压,易于清洗。聚丙烯(PP)、聚四氟乙烯(PTFE)或聚乙烯(PE)容器是合适的,但聚乙烯不耐高压。玻璃瓶通常(但不总是)适用于有机化合物和生物样品的采集”。同时,其条款 6.3 对样品容器的填充状态也有较为具体的说明“在运输过程中为尽量减少对样品的影响,建议满瓶采样。非满瓶采样所存在的问题包括:1)在运输过程中样品的扰动会增强、破坏原有颗粒物的形态;2)样品与采样容器中的空气相互作用,导致样品中污染物的损失;3)物质的氧化,导致例如重金属的沉淀”。同样,EPA-821-R-02-012-2002 也在其条款 8.1.3 中规定“在废水采集和转移期间,应使曝气最小化,以减少挥发性化学物质的损失。样品应沿瓶内壁缓慢倒入,并与瓶塞间不留空隙”。

因此,本标准样品采集部分直接参照了上述标准的相关规定。

5.8.2 样品运输与保存

样品的稳定性主要取决于样品类型,以及样品的化学和生物学性质,也取决于保存条件。样品有在短时间内发生变质的风险,因此必须采取必要的保存措施,并尽快地进行分析。ISO 5667-16-2017 在其条款 6.6 中规定“运输期间通常以 2 °C~8 °C 保存样品”,在其条款 7.2 保存和储藏中规定“如果不能在 48 h 内开始试验,应尽快将样品于-18 °C 及以下冻结。通过减少样品体积,即样品容器的大小,可以将冻结和解冻所需的时间减至最小。一般来说,使用一升容器冷冻(注入最多 0.5 L~0.7 L 的样品)是合适的。需要更多样品测试时,样品应被均匀化并分成若干子样。对大多数生物试验来说,样品保存期不超过两个月”。而《污水监测技术规范》(HJ 91.1-2019)则在附录 A 常用污水监测项目的采样和样品保存要求中规定用于毒性测定的样品冷藏保存期限不超过 24 h。因间歇排放的生活污水和工业废水采集

混合样品时，需 24 h 内采集若干份等体积的样品混合为 1 个样品，该规定难以执行。同时，对于藻类生长抑制试验这一需要大量准备工作的测试方法来说，24 h 内启动测试的要求并不易达到。

本标准研究也对实际样品的保存期限作了验证。对 2 个城镇污水、2 个化工废水、2 个制药废水和 1 个电镀废水等 7 个实际样品分别在采样后 6 h、48 h 和 60 d 开展生长抑制试验，其中 6 h 和 48 h 均为 2 °C~8 °C 冷藏保存的样品，60 d 为-18 °C 冷冻保存的样品。结果显示，各样品不同保存期限的 LID 标准偏差均小于或等于 6 次独立试验的 LID 标准偏差，表明样品保存引起的试验结果变异小于试验变异，说明样品在上述保存方法和保存期限内仍然有效（见表 6）。

表 6 样品不同保存期限的 LID 测定结果

样品类别	LID				
	6 h	48 h	60 d	S_t	S_6
城镇污水 1	3	3	3	0	0
城镇污水 2	8	8	6	1	1.1
化工废水 1	8	8	6	1	1.1
化工废水 2	4	4	4	0	0
制药废水 1	2	3	2	0.5	0.5
制药废水 2	2	2	2	0	0
电镀废水	24	24	24	0	0

注： S_t 为不同样品保存时间 LID 的标准偏差， S_6 为 6 次独立试验 LID 的标准偏差。

根据实验室验证结果，本标准参照了 ISO 5667-16-2017 标准对样品保存期限的要求。

5.8.3 样品预处理

5.8.3.1 样品解冻

ISO 5667-16-2017 在其条款 7.3 解冻中规定：

冷冻储存的样品在使用前需尽快解冻，建议在不超过 25 °C 的温水浴中，轻轻摇晃，以避免局部过热。或者，样品也可在 2 °C~8 °C 的温度下避光过夜解冻。

本标准条款 8.3.1 参照了上述规定。

5.8.3.2 悬浮物去除

参照本编制说明第 5.4.3 节，本标准条款 8.3.2 分别规定了生活污水、工业废水和地下水中的悬浮物去除方法以及地表水中的藻类等悬浮物的去除方法。

5.8.3.3 pH 值调节

参照本编制说明第 5.4.4 节，本标准规定通常不调节样品 pH 值，如需调节，则方法参照了 ISO 8692-2012 标准。实验人员可根据试验目的，同时测试 pH 值调节前后的样品，比较试验结果。

5.8.3.4 营养盐添加

参照本编制说明第 5.4.5 节，本标准规定样品与需添加与培养基等量的营养盐。

5.9 测试步骤

5.9.1 LID 测定试样组制备

5.9.1.1 试样稀释

因明确了水样浓度设置，测定 LID 时一般不做预试验。本标准术语定义明确了稀释倍数为整数，条款 9.1.1 的样品稀释参照了 HJ 1069-2019 的稀释系列设置，并按照逐级稀释的方式（见图 9 示意）给出了具体稀释方法。



图 9 样品逐级稀释方法

5.9.1.2 试样组制备

ISO 8692-2012 条款 7.5 规定：

通过往试验容器中混合适当体积的受试样品或受试样品储备液，生长培养基和接种物来制备试样组。所有试验容器中试验溶液的总容积、生长培养基营养物质的浓度和细胞密度应保持一致。每个受试样品浓度组至少设置 3 个平行。

本标准条款 9.1.2.1 试样组的平行设置参照了 ISO 标准。

关于试验容器及其容积负荷，OECD TG 201-2006 和 GB/T 21805-2025 标准均未有明确规定；ISO 8692-2012 列举了带透气塞的 250 mL 三角瓶但并未规定具体容积负荷；GB/T 31270.14-2025 和《化学品测试方法 生物系统效应卷》均列举了 125 mL、250 mL 和 500 mL 规格的三角瓶，并分别对应试样体积为 40 mL~60 mL、70 mL~100 mL 和 100 mL~150 mL；而新西兰标准 Appendix to MFE 80205 则规定了更严格的容积负荷，即试样体积与容器容积的比不大于 20%。

为提高测试结果的可比性以及确保在测试过程中试样有足够的 CO₂ 交换, 减少 pH 值升高的风险, 结合专家组意见, 本标准参照同一规格三角瓶使用更少试样量体积规定的新西兰标准, 同时考虑到使用 125 mL 或更少体积规格三角瓶的试样量对于后续生物量测定和 pH 测定偏少的问题, 本标准规定了 250 mL 的三角瓶作为培养容器。

5.9.2 EC₅₀ 测定试样组制备

5.9.2.1 预试验

预试验用于确定产生毒性的大致浓度范围, 以判断下一步选择开展正式试验或限度试验, 并为正式试验提供试样组浓度设置参考。

参照 ISO 8692-2012 在其 7.3 测试样品浓度选择中的说明“通过开展跨越几个数量级浓度的预试验可以确定最佳的适宜浓度范围, 预试验不要求设置平行”。本标准条款 9.2.1 预试验的样品稀释参照 ISO 标准, 并给出了更具可操作性的规定。由于 EC₅₀ 需通过对剂量-效应回归后求得, 当预试验的样品最高生长抑制率小于 40% 时, EC₅₀ 值极可能大于 100% 样品浓度, 回归时存在数据外推现象, 结果的置信度不高。因此本标准规定了预试验样品生长抑制率是否大于 40% 作为判定开展限度试验或正式试验的依据。

5.9.2.2 正式试验

ISO 8692-2012 条款 7.3 试验浓度选择中规定:

藻类应暴露在以几何级数排列的样品浓度下, 稀释比应不超过 3.2..... 应选择浓度, 以获得至少一个浓度的抑制率低于预期的 ErC_x 值, 另一个浓度的抑制率高于预期的 ErC_x 值。此外, 至少应包含 10%~90% 之间的两个抑制水平以提供回归分析数据。

本标准条款 9.2.2 参照上述规定。

5.9.2.3 限度试验

ISO 8692-2012 在其条款 7.3 试验浓度选择中规定“限度试验只设置一个浓度, 以证明没有毒性, 限度试验至少 6 个平行”。本标准条款 9.2.3 参照上述规定。

5.9.3 空白对照组制备

针对空白对照组制备的要求, 本标准条款 9.3 参照 ISO 8692-2012 标准, 规定需使用培养基制备 6 个平行的空白对照。

5.9.4 接种物制备和接种

为确保空白对照组藻类在整个试验期间保持指数增长, 防止因过高藻密度大量消耗 CO₂ 而导致 pH 值的过度升高, 并避免试样组水相中待测物质的耗尽, 试验需以较低的细胞密度接种。目前, 国内外各标准方法对初始接种细胞密度的规定略有不同, 其中, ISO 8692-2012 为不超过 10⁴ cells/mL, OECD TG 201-2006 为 5 × 10³ ~ 10⁴ cells/mL, 美国 EPA-821-R-02-013-2002 为 10⁴ cells/mL, 而 GB/T 21805-2025 和 GB/T 31270.14-2014 则均规定了 5 × 10³ ~ 5 × 10⁴ cells/mL 的范围。为了给出相对统一的初始藻类细胞密度和便于试验操作, 本标准规定了 5 × 10³ cells/mL ~ 1 × 10⁴ cells/mL 的初始细胞接种密度。同时, 为了减少

因接种藻细胞悬液体积过大而引起的试验结果偏离,本标准还参照 EPA-821-R-02-013-2002,规定了接种物的制备方法,即通过预先稀释或离心预培养藻细胞悬液,以获得藻密度相对统一的制备藻细胞悬液。然后通过规定一个统一的接种藻细胞悬液量,以进一步提升试验结果的可重复性。

5.9.5 测试培养

为使试验中的每个三角瓶接收到相对一致的光照,避免光强差异成为试验的变异因素,参照ISO 8692-2012标准,本标准规定“试验组和对照组各三角瓶之间液面高度处的光照强度变异系数应保持在±10%以内”。

本标准测试培养时间参照ISO 8692-2012条款7.7中的规定“测试应持续72 h±2 h”。

5.9.6 观察和计数

ISO 8692-2012 在其条款 7.7 测定中规定:

至少每 24 小时测量一次每个试验瓶(包括对照组)中的细胞密度。测量前彻底混合试验液。取出用于测定的试验液最好不放回试验瓶。标称细胞密度可用作初始细胞密度,无需再进行初始细胞密度的测量。试验应持续 72 h±2 h。试验结束时,在每个试样浓度和对照中,测量至少一个试验瓶的 pH 值。

本标准观察和计数的频次直接参照了 ISO 8692-2012 的相关规定。

藻类生物量的测定方法较多,其中显微镜细胞计数法为基本方法。显微计数法操作简单,不需要进行特殊的处理和设置。针对显微镜计数的具体操作,ISO 8692-2012 未做明确规定。而《水质 浮游植物的测定 0.1 mL 计数框-显微镜计数法》(HJ 1216-2021)^[45]条款 8.3.2.3.5 要求“至少计数 2 次,以平均值作为计数结果,若 2 次计数结果偏差大于 15%,应重新计数”。

为减少因计数产生的误差,显微镜细胞计数的具体方法参照了 HJ 1216-2021 标准。

除显微镜细胞计数法外,电子颗粒计数法、荧光法和分光光度法在藻类生长抑制试验中也有应用,特别是针对具有较少背景干扰的纯化学品。ISO 8692-2012 也在其条款 6.2 藻类细胞密度测定设备中说明:

当足够灵敏且与细胞密度高度相关时,可通过使用荧光仪(例如,体外荧光或 DCMU 增强的体内荧光)等间接程序测定藻类密度。所用仪器应能测定低至 10⁴ cells/mL 的细胞密度,并能区分藻类生长和干扰效应,例如颗粒物的存在和样品的颜色。分光光度计可能足够灵敏,可以测定 10⁴ cells/mL,前提是可以提供足够的光径长度(到 10 cm)。

5.9.6.1 常用的其他生物量测定方法及工作原理

电子颗粒计数法是一种基于阻抗测量原理和现代信号测量方法的粒子测量技术,其原理是悬浮细胞以恒定速度通过一个几何上精确的毛细圆孔,测量时通过测量孔上的两个电极产生低压脉冲,使充满电解液的测量孔有一个特定电阻,由于完整的细胞一般被当作绝缘体,通过测量孔上会有一个升高的电阻。使用电子颗粒计数器对近头状尖胞藻的粒径作了分析,测得的近头状尖胞藻细胞粒径主要分布在 2.5 μm~7.0 μm 之间,峰值在 4.5 μm 左右(见图 10),不同培养批次测定结果略有不同。由于电子颗粒计数器假定的细胞为圆形,受通过测

量孔时藻细胞体态的影响，粒径测定结果与 OECD 201-2006 附录 2 描述的近头状尖胞藻的长度在 $8\ \mu\text{m}\sim 14\ \mu\text{m}$ 之间，宽度在 $2\ \mu\text{m}\sim 3\ \mu\text{m}$ 之间的个体大小特征会有所差异。

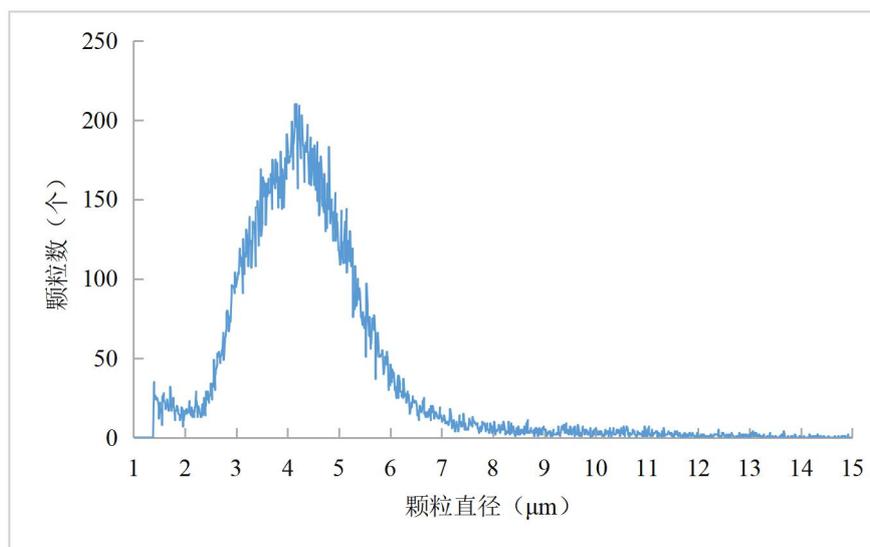


图 10 电子颗粒计数仪测得的近头状尖胞藻粒径分布特征

而荧光法则是一种利用藻类叶绿素荧光特性的方法，可进一步反演叶绿素浓度和藻密度。其原理是同一种藻受到不同波长激发光激发时，产生的荧光强度效率不同，不同门类的藻在受到相同波长的单位强度激发光激发时，发出的荧光强度也不同，但无论激发光的波长是多少，藻细胞吸收后将其转化为 $685\ \text{nm}$ 中心波长的活体荧光。近头状尖胞藻的荧光特性如图 11 所示^[46]。目前，在藻类生物量测定中荧光法的使用非常普遍，并且有许多专门用于藻类叶绿素测定的相关仪器。其测定系统中一般使用多个激发波长（一般为 $3\sim 4$ 个）的调制光，以很高的频率不断开关光源，检测器通过选择性放大检测被这种调制光激发的荧光。调制光的使用可提高检测方法的信噪比，而使用多个激发波长可以实现藻类分类鉴定的目的。

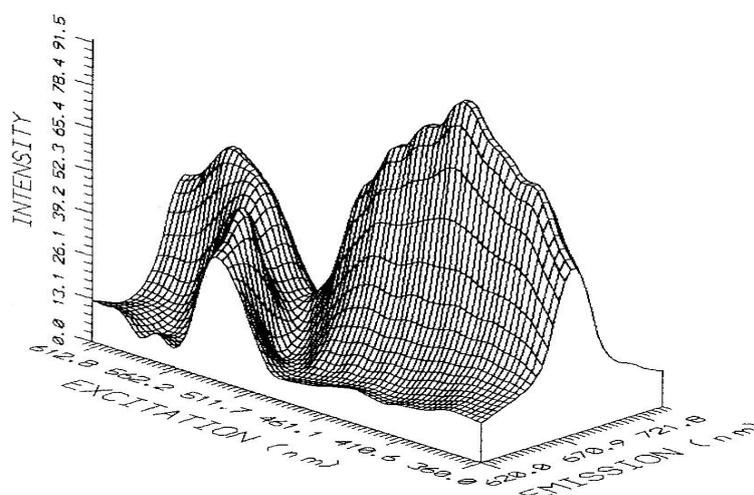


图 11 近头状尖胞藻荧光图谱

分光光度法则是利用了藻类叶绿素对可见光谱的吸收,可使用特定波长测定其吸光度后反演叶绿素含量或生物量。用 340 nm~700 nm 的吸收光谱扫描近头状尖胞藻,共出现藻类吸收峰 5 个,分别为 364 nm、384 nm、438 nm、624 nm 和 682 nm (见图 12)。反演时,一般在 600 nm~800 nm 这一叶绿素红区吸收范围内选择波长用于检测^[47],如国家标准《水质 叶绿素 a 的测定 分光光度法》(HJ 897-2017)就规定了 630 nm、647 nm、664 nm 和 750 nm 的多波长叶绿素 a 体外测定方法^[48]。

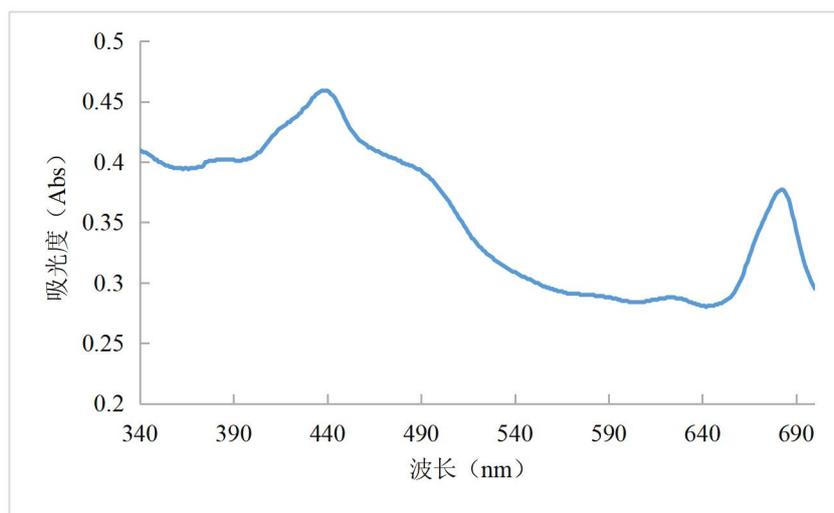


图 12 近头状尖胞藻吸收光谱

5.9.6.2 测定结果相关性及精密度

编制组对各生物量测定替代方法的结果相关性和精密度作了验证。根据生长抑制试验的初始接种细胞密度和增长倍数情况,配制细胞密度在 3.2×10^3 cells/mL~ 1×10^6 cells/mL 之间的 5 个藻细胞悬液。分别使用电子颗粒计数仪计数 $2 \mu\text{m}$ ~ $14 \mu\text{m}$ 粒径范围,多通道叶绿素荧光仪使用 470 nm、520 nm、645 nm 和 665 nm 等 4 个激发波长,分光光度计则配 5 cm 吸收池使用 682 nm 吸收波长测定。结果表明,各方法测定结果与细胞密度之间均具有极高的线性关系,电子颗粒计数法 R^2 值为 0.9996,叶绿素荧光法和分光光度法则均为 0.9997 (见图 13、图 14 和图 15)。

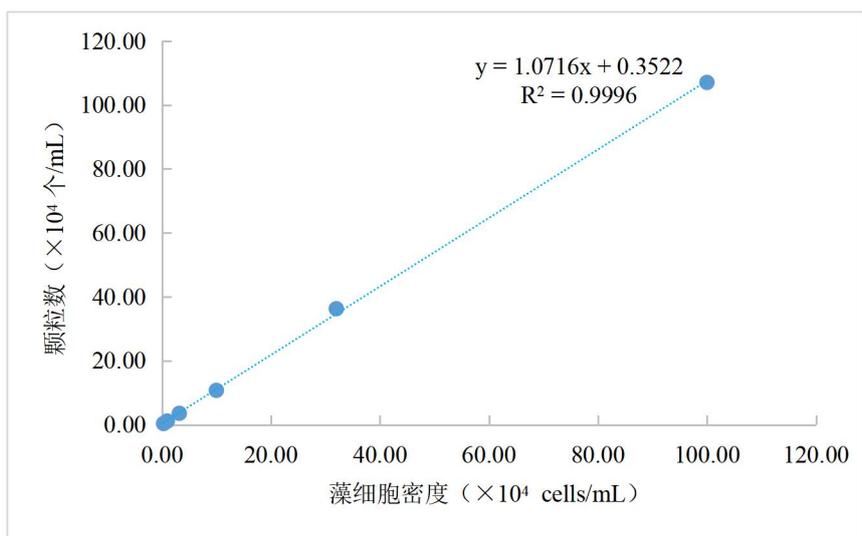


图 13 电子颗粒计数法测定结果与藻细胞密度的相关性

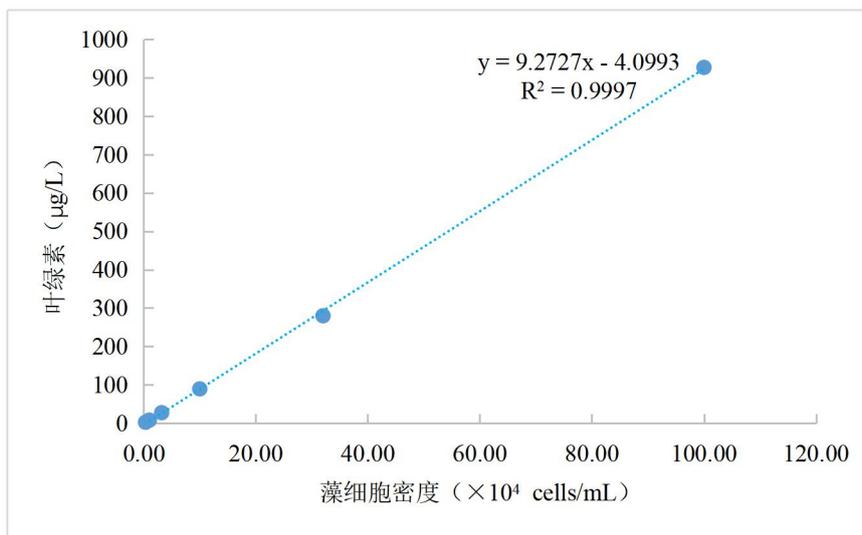


图 14 荧光法测定结果与藻细胞密度的相关性

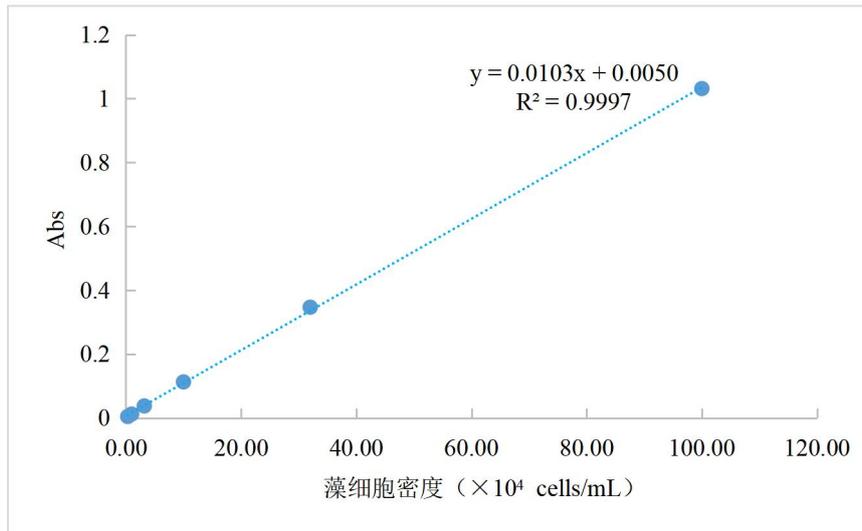


图 15 分光光度法测定结果与藻细胞密度的相关性

在精密度方面，上述测定方法平行间的相对标准偏差（RSD）分别在 0.65%~5.14%、0.70%~3.07%和 0.73%~13.32%之间（表 7）。在测定较高藻细胞密度时，各方法精密度无明显差异，且 RSD 均小于 5%，而在测定 3.2×10^3 cells/mL 和 1×10^4 cells/mL 藻细胞密度时，分光光度法精密度明显低于叶绿素荧光法和电子颗粒计数法，RSD 分别为 13.32%和 8.33%。

表 7 不同细胞密度对测定方法的影响

细胞密度 (cells/mL)	平行	颗粒密度 (cells/mL)			叶绿素反演浓度 ($\mu\text{g/L}$)			Abs		
		X_i	\bar{X}	RSD	X_i	\bar{X}	RSD	X_i	\bar{X}	RSD
3.2×10^3	1	3.490×10^3	3.681×10^3	5.1%	2.40	2.43	2.5%	0.004	0.004	13.3%
	2	3.868×10^3			2.50			0.004		
	3	3.684×10^3			2.39			0.005		
1.0×10^4	1	1.144×10^4	1.146×10^4	0.8%	7.74	7.98	3.1%	0.012	0.012	8.3%
	2	1.138×10^4			8.23			0.013		
	3	1.156×10^4			7.98			0.011		
3.2×10^4	1	3.530×10^4	3.562×10^4	0.8%	26.89	27.34	1.5%	0.039	0.037	4.1%
	2	3.570×10^4			27.46			0.037		
	3	3.586×10^4			27.68			0.036		
1.0×10^5	1	1.069×10^5	1.074×10^5	0.7%	89.14	89.35	0.7%	0.116	0.113	2.7%
	2	1.082×10^5			90.06			0.11		
	3	1.071×10^5			88.86			0.112		
3.2×10^5	1	3.616×10^5	3.627×10^5	1.4%	282.76	279.84	0.9%	0.344	0.347	0.7%
	2	3.582×10^5			278.50			0.347		
	3	3.684×10^5			278.25			0.349		
1.0×10^6	1	1.061×10^6	1.070×10^6	0.9%	921.03	927.10	1.1%	1.025	1.032	1.4%
	2	1.069×10^6			938.87			1.048		
	3	1.081×10^6			921.40			1.022		

综上所述，电子颗粒计数仪、荧光仪和分光光度计测定结果与藻细胞密度之间均具有极高的线性关系，均可作为藻类生长抑制试验生物量测定的替代方法。但对于分光光度计的吸

收池光程, OECD 和 ISO 分别规定了 4 cm 以上和 10 cm 以上这两个不同光程。从测定 1×10^4 cells/mL 及以下藻密度的验证结果上看, 分光光度计 5 cm 光径吸收池的相对标准偏差明显过高。

5.9.6.3 样品背景对测定方法选择的影响

5.9.6.3.1 样品的颜色

样品的颜色主要会影响光密度法生物量测定结果的准确性。针对使用荧光仪和分光光度计这两种生物量测定手段, 配制并测定藻细胞密度均为 1×10^4 cells/mL, 活性艳蓝色度分别为 8 倍、30 倍、80 倍、300 倍、800 倍不同色深的模拟样品, 同时测定不含藻的等浓度活性艳蓝作为背景空白, 对扣除背景值后的测定结果开展精密度和正确度验证。荧光仪的验证结果表明 (见表 8), 当样品色度在 30 倍及以下时, 样品颜色干扰对扣除背景值后的测定结果影响较小, 测定结果平行间的相对标准偏差、测定结果与参考值 (活性艳蓝浓度为 0) 之间的相对误差 (RE) 均在 $\pm 10\%$ 以内, 但随着样品颜色变深, RSD 和 RE 均逐步增大。

表 8 样品颜色对叶绿素荧光仪测定的影响

样品色度 (倍)	平行	藻细胞密度 (cells/mL)	叶绿素反演浓度 ($\mu\text{g/L}$)			RSD	RE
			测定值	背景值扣除	均值		
0	1	1×10^4	9	7.22	7.17	1.7%	—
	2	1×10^4	8.81	7.03			
	3	1×10^4	9.04	7.26			
	4	0	1.78	—	—	—	—
8	1	1×10^4	15.02	7.1	6.97	2.0%	-2.8%
	2	1×10^4	14.74	6.82			
	3	1×10^4	14.9	6.98			
	4	0	7.92	—	—	—	—
30	1	1×10^4	25.64	6.38	6.77	7.0%	-5.6%
	2	1×10^4	25.89	6.63			
	3	1×10^4	26.56	7.3			
	4	0	19.26	—	—	—	—
80	1	1×10^4	55.12	6.26	7.18	11.3%	0.1%
	2	1×10^4	56.68	7.82			
	3	1×10^4	56.3	7.44			
	4	0	48.86	—	—	—	—
300	1	1×10^4	106.84	8.94	7.66	17.3%	6.9%
	2	1×10^4	104.2	6.3			
	3	1×10^4	105.66	7.76			
	4	0	97.9	—	—	—	—
800	1	1×10^4	162.99	6.59	6.40	18.2%	-0.7%
	2	1×10^4	161.56	5.16			
	3	1×10^4	163.86	7.46			
	4	0	156.4	—	—	—	—

有色样品干扰分光光度计测定的验证结果表明（见表 9），当样品色度在 30 倍及以下时，样品颜色对扣除背景值后的测定结果影响较小，测定结果平行间的相对标准偏差、测定结果与参考值（活性艳蓝浓度为 0）之间的相对误差均在 ±10% 以内，但随着样品颜色变深，相对误差急剧增大。

表 9 样品颜色对分光光度计测定的影响

样品色度 (倍)	平行	藻细胞密度 (cells/mL)	Abs			RSD	RE
			测定值	背景值扣除	均值		
0	1	1×10 ⁴	0.012	0.012	0.012	4.7%	—
	2	1×10 ⁴	0.012	0.012			
	3	1×10 ⁴	0.013	0.013			
	4	0	0	—	—	—	—
8	1	1×10 ⁴	0.016	0.011	0.012	5.0%	-5.4%
	2	1×10 ⁴	0.017	0.012			
	3	1×10 ⁴	0.016	0.011			
	4	0	0.005	—	—	—	—
30	1	1×10 ⁴	0.031	0.014	0.013	4.3%	8.1%
	2	1×10 ⁴	0.031	0.014			
	3	1×10 ⁴	0.03	0.013			
	4	0	0.017	—	—	—	—
80	1	1×10 ⁴	0.084	0.016	0.015	3.8%	24.3%
	2	1×10 ⁴	0.084	0.016			
	3	1×10 ⁴	0.083	0.015			
	4	0	0.068	—	—	—	—
300	1	1×10 ⁴	0.271	0.025	0.022	10.5%	78.4%
	2	1×10 ⁴	0.267	0.021			
	3	1×10 ⁴	0.267	0.021			
	4	0	0.246	—	—	—	—
800	1	1×10 ⁴	1.051	0.065	0.061	20.6%	391.9%
	2	1×10 ⁴	1.033	0.047			
	3	1×10 ⁴	1.057	0.071			
	4	0	0.986	—	—	—	—

5.9.6.3.2 样品悬浮物

悬浮物主要通过影响藻细胞的识别或遮光作用而干扰生物量的测定。针对电子颗粒计数器、荧光仪和分光光度计这三种生物量测定手段，使用瓷粉分别配制浊度为 25 NTU、50 NTU、100 NTU、200 NTU 和 400 NTU，藻细胞密度均为 1×10⁴ cells/mL 的模拟样品后，测定其生物量。同时测定不含藻的等浓度瓷粉作为背景空白，对扣除背景值后的测定结果开展精密度和正确度验证分析。电子颗粒计数器的验证结果表明（见表 10），当浊度在 100 NTU 及以

下时，颗粒物对测定结果无显著影响，测定结果平行间的相对标准偏差、测定结果与参考值（瓷粉浓度为0）之间的变异系数均在±10%以内，但随着颗粒物浓度的上升，测定结果的相对标准偏差和相对误差均急剧增大。

表 10 样品颗粒物对电子颗粒计数仪测定的影响

样品浊度 (NTU)	平行	藻细胞密度 (cells/mL)	颗粒密度 (个/mL)			RSD	RE
			测定值	背景值扣除	均值		
0	1	1×10 ⁴	1.129×10 ⁴	1.057×10 ⁴	1.052×10 ⁴	1.8%	—
	2	1×10 ⁴	1.139×10 ⁴	1.067×10 ⁴			
	3	1×10 ⁴	1.103×10 ⁴	1.031×10 ⁴			
	4	0	7.16×10 ²	—	—	—	—
25	1	1×10 ⁴	1.418×10 ⁴	1.038×10 ⁴	1.067×10 ⁴	4.2%	1.4%
	2	1×10 ⁴	1.499×10 ⁴	1.119×10 ⁴			
	3	1×10 ⁴	1.424×10 ⁴	1.044×10 ⁴			
	4	0	3.803×10 ³	—	—	—	—
50	1	1×10 ⁴	2.024×10 ⁴	1.051×10 ⁴	1.065×10 ⁴	1.7%	1.2%
	2	1×10 ⁴	2.032×10 ⁴	1.059×10 ⁴			
	3	1×10 ⁴	2.058×10 ⁴	1.085×10 ⁴			
	4	0	9.734×10 ³	—	—	—	—
100	1	1×10 ⁴	3.810×10 ⁴	1.167×10 ⁴	1.132×10 ⁴	2.8%	7.6%
	2	1×10 ⁴	3.749×10 ⁴	1.106×10 ⁴			
	3	1×10 ⁴	3.767×10 ⁴	1.124×10 ⁴			
	4	0	2.643×10 ⁴	—	—	—	—
200	1	1×10 ⁴	9.234×10 ⁴	6.690×10 ³	9.000×10 ³	22.9%	-14.5%
	2	1×10 ⁴	9.531×10 ⁴	9.660×10 ³			
	3	1×10 ⁴	9.630×10 ⁴	1.065×10 ⁴			
	4	0	8.565×10 ⁴	—	—	—	—
400	1	1×10 ⁴	2.817×10 ⁵	1.242×10 ⁴	6.960×10 ³	85.1%	-33.8%
	2	1×10 ⁴	2.771×10 ⁵	7.80×10 ³			
	3	1×10 ⁴	2.699×10 ⁵	6.60×10 ²			
	4	0	2.693×10 ⁵	—	—	—	—

样品中颗粒物对叶绿素荧光仪测定影响的验证结果表明（见表 11），样品中不同浓度的颗粒物对扣除背景值后的测定结果均无显著影响，测定结果平行间的相对标准偏差、测定结果与参考值（瓷粉浓度为0）之间的相对误差均在±10%以内。

表 11 样品颗粒物对叶绿素荧光仪测定的影响

样品浊度 (NTU)	平行	藻细胞密度 (cells/mL)	叶绿素反演浓度 (µg/L)			RSD	RE
			测定值	背景值扣除	均值		
0	1	1×10 ⁴	9	7.22	7.17	1.7%	—
	2	1×10 ⁴	8.81	7.03			
	3	1×10 ⁴	9.04	7.26			

样品浊度 (NTU)	平行	藻细胞密度 (cells/mL)	叶绿素反演浓度 (µg/L)			RSD	RE
			测定值	背景值扣除	均值		
	4	0	1.78	—	—	—	—
25	1	1×10 ⁴	9.02	6.96	7.37	4.9%	2.8%
	2	1×10 ⁴	9.59	7.53			
	3	1×10 ⁴	9.69	7.63			
	4	0	2.06	—	—	—	—
50	1	1×10 ⁴	10.06	7.55	7.87	7.8%	9.7%
	2	1×10 ⁴	11.08	8.57			
	3	1×10 ⁴	9.98	7.47			
	4	0	2.51	—	—	—	—
100	1	1×10 ⁴	11.1	7.4	7.04	4.8%	-1.9%
	2	1×10 ⁴	10.69	6.99			
	3	1×10 ⁴	10.43	6.73			
	4	0	3.7	—	—	—	—
200	1	1×10 ⁴	12.69	6.48	7.11	7.8%	-0.8%
	2	1×10 ⁴	13.73	7.52			
	3	1×10 ⁴	13.53	7.32			
	4	0	6.21	—	—	—	—
400	1	1×10 ⁴	16.37	7.02	7.51	6.2%	4.7%
	2	1×10 ⁴	17.3	7.95			
	3	1×10 ⁴	16.9	7.55			
	4	0	9.35	—	—	—	—

样品中颗粒物对分光光度计测定影响的验证结果表明（见表 12），样品中不同浓度的颗粒物对分光光度计的测定结果均有显著影响，测定结果平行间的相对标准偏差、测定结果与参考值（瓷粉浓度为 0）之间的相对误差均较大。

表 12 样品中颗粒物对分光光度计测定的影响

样品浊度 (NTU)	平行	藻细胞密度 (cells/mL)	Abs			RSD	RE
			测定值	背景值扣除	均值		
0	1	1×10 ⁴	0.012	0.012	0.012	4.7%	—
	2	1×10 ⁴	0.012	0.012			
	3	1×10 ⁴	0.013	0.013			
	4	0	0	—	—	—	—
25	1	1×10 ⁴	0.193	0.006	0.004	144.3%	-70.3%
	2	1×10 ⁴	0.185	-0.002			
	3	1×10 ⁴	0.195	0.008			
	4	0	0.187	—	—	—	—
50	1	1×10 ⁴	0.341	0.018	0.02	10.2%	64.9%
	2	1×10 ⁴	0.344	0.021			
	3	1×10 ⁴	0.345	0.022			

样品浊度 (NTU)	平行	藻细胞密度 (cells/mL)	Abs			RSD	RE
			测定值	背景值扣除	均值		
	4	0	0.323	—	—	—	—
100	1	1×10 ⁴	0.639	0.048	0.042	23.2%	243.2%
	2	1×10 ⁴	0.639	0.048			
	3	1×10 ⁴	0.622	0.031			
	4	0	0.591	—	—	—	—
200	1	1×10 ⁴	1.125	0.018	0.021	10.1%	67.6%
	2	1×10 ⁴	1.129	0.022			
	3	1×10 ⁴	1.128	0.021			
	4	0	1.107	—	—	—	—
400	1	1×10 ⁴	1.98	0.047	0.047	7.4%	283.8%
	2	1×10 ⁴	1.984	0.051			
	3	1×10 ⁴	1.977	0.044			
	4	0	1.933	—	—	—	—

上述验证结果表明, 这些生物量替代测定方法的结果准确性与精密度均在不同程度上受样品颜色和(或)悬浮物的影响。特别是, 荧光仪受样品颜色, 电子颗粒计数仪受样品悬浮物的影响较为突出, 而分光光度计则同时受这两类因素影响, 适用性较差。同时, 考虑到污染物对藻类荧光特性、吸光特性等影响与对藻类分裂增殖的抑制并不完全同步, 如使用不同的生物量测定方法可能会出现试验结果的不一致, 造成监管尺度的不统一。因此, 根据开题论证会专家组意见, 本标准明确藻类生物量测定采用显微镜计数法。

5.9.7 pH 值测定

pH 值是藻类生长的重要限制因子, 因此测试培养期间 pH 值的变化情况也是试验质量控制的重要指标。因此, 从试验开始到结束时应监测试验容器中藻细胞悬液的 pH 值。ISO 8692-2012 在其条款 7.7 中规定“试验结束后测定试验组各浓度和对照组至少一个平行的 pH 值”。本标准参照该规定。

5.10 结果计算与表示

5.10.1 比生长率计算

本标准参照了 ISO 8692-2012 条款 9.2 的比生长率计算规定:

空白对照组和试验组各浓度试样中藻类的比生长率, 按以下公式计算。

$$\mu = \frac{\ln n_L - \ln n_0}{t_L - t_0}$$

式中: μ ——藻类的比生长率, d⁻¹;

n_L —— t_L 时间测定的藻细胞密度, cells/mL;

n_0 ——初始接种时藻细胞密度, cells/mL;

t_L ——试验结束时间或空白对照组在指数生长期内最后一次测定时间, d;

t_0 ——试验开始时间，d。

5.10.2 生长抑制率计算

本标准参照了 ISO 8692-2012 条款 9.2 的生长抑制率计算规定：
试验组各浓度以比生长率为基础的生长抑制率，按以下公式计算。

$$I_{\mu i} = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} \times 100$$

式中： $I_{\mu i}$ ——试验组第 i 浓度试样中藻类的生长抑制率，%；

μ_c ——空白对照组平均比生长率， d^{-1} ；

μ_i ——试验组各浓度平行的比生长率， d^{-1} 。

5.10.3 LID 确定

本标准 LID 的确定参照 ISO 8692-2012 条款 10 的规定：

以稀释倍数法测试样品毒性时，把抑制率 < 5% 的最高浓度测试介质稀释倍数 (D) 定义为最低无效应稀释度 (LID)。该稀释度表示为试验液中样品体积分数的倒数 (例如，如果废水含量为四分之一 (25% 体积分数)，稀释度 $D=4$)。

尽管抑制率 5% 为剂量效应模型中的效应参数，由于本标准的 LID 通过开展固定的、非等比间隔的不同稀释度试验后确定，其浓度并不适合通过回归的方式获得。同样，由于抑制率是各试样浓度比生长率与对照组比生长率平均值的比较结果，与对照组比生长率的数据分布特征无关，因此作为阈值浓度，也不宜采用类似于无观察效应浓度 (NOEC) 或等效检验 (Equivalence Testing) 等检验方法进行分析，如 t 检验、Dunnett 检验、Mann-Whitney U 检验或 TOST 检验等^[49]，这些方法用于检验处理组和对照组之间是否存在差异，或规定等效限值后是否存在差异。另外，处理组每个稀释度由于规定了 3 个平行，自由度过小，也不宜采用平均抑制率置信限的方法进行检验。作为一种简化测试方法，ISO 5667-16-2017 也在其条款 4.2.2 最低无效应稀释倍数 (LID) 中规定“这种方法不需要进一步的统计分析 (例如假设检验)”。

因此，本标准以算术平均抑制率小于 5% 的最低稀释倍数作为最低无效应稀释倍数。

5.10.4 EC_{50} 计算

ISO 8692-2012 在其条款 9.3 中规定：使用合适的非线性模型对实验数据进行拟合。如果数据太少或不确定，无法进行回归分析，或者如果抑制作用似乎不符合常规的浓度-效应关系 (例如刺激效应)，则可以采用图解法。在这种情况下，肉眼配合绘制一条平滑的浓度-效应关系曲线，并从该图中读取 $ErCx$ 值。

关于 EC_{50} 的计算，OECD TG 201 也在其条款 54 中指出，数据经线性化转换后，例如使用概率单位 (probit)、对数单位 (logit) 或威布尔单位 (Weibull)，可能可以用加权线性回归统计，但非线性回归方法是更优的技术，能更好地处理不可避免的不规则数据以及偏离平滑曲线的数据，特别是当接近零抑制或完全抑制时，这种不规则性可能会因转换而被放

大，干扰分析。需要注意的是，使用概率单位、对数单位或威布尔单位的标准分析方法旨在用于定性（如死亡率或存活率）数据，若用于生长或生物量数据则必须加以调整。

针对藻类生长抑制试验，通常可根据数据分布是否对称、是否存在低浓度兴奋效应等特征，可选择逻辑斯蒂模型（Logistic Model）、Weibull 模型（Weibull Model）、CRS 兴奋效应模型（Cedergreen-Ritz-Streibig model），对试样浓度与抑制率做回归分析，计算样品的 EC₅₀ 及其 95% 置信区间^[50,51]。非线性模型的拟合非常复杂，需要大量计算，往往要借助商用统计软件，或者采用开源的 R 语言中的“drc”软件包来实现。GB/T 21805-2025 在其附录 D 中对非线性回归数据分析的总体思路、回归分析、模型、程序、加权因子、归一化响应、逆置信区间等基本原理解和注意事项作了说明。

而 EPA-821-R-02-013-2002 在其附录 M 条款 4 中指出 IC_p（某一百分比抑制浓度）可通过对两个浓度之间的线性内插来估算，并提供了基于比生长率或生物量的 IC_p 估算公式：

$$IC_p = C_J + [M_1(1 - P/100) - M_J] \frac{(C_{J+1} - C_J)}{(M_{J+1} - M_J)}$$

式中，IC_p——相对于经平滑处理的对照组平均响应值出现百分比降低时的估算浓度；

C_J——观测平均响应值大于 M₁(1 - P/100) 的受试物浓度；

C_{J+1}——观测平均响应值小于 M₁(1 - P/100) 的受试物浓度；

M₁——对照组的平均响应值；

M_J——浓度 J 的平均响应值；

M_{J+1}——浓度 J+1 的平均响应值；

P——相对于对照组响应值的响应百分比降低值。

以某工业废水对近头状尖胞藻生长抑制试验的细胞计数结果为例（见表 13），分别使用直线内插法和逻辑斯蒂非线性回归计算样品的 72 h EC₅₀ 及其 95% 置信区间。计算结果表明，不同统计方法无明显差异（见表 14）。

表 13 某工业废水对近头状尖胞藻生长抑制试验的藻细胞计数结果

废水浓度 (%)	平行	细胞密度 (×10 ⁴ cells/mL)		废水浓度 (%)	平行	细胞密度 (×10 ⁴ cells/mL)	
		0 h	72 h			0 h	72 h
0	1	0.5	118.5	12.50	1	0.5	87.5
	2	0.5	112.0		2	0.5	92.0
	3	0.5	123.5		3	0.5	98.0
	4	0.5	110.5	25.00	1	0.5	55.0
	5	0.5	118.0		2	0.5	52.0
	6	0.5	121.5		3	0.5	48.5
3.12	1	0.5	112.5	50.00	1	0.5	23.0
	2	0.5	116.0		2	0.5	26.0
	3	0.5	121.0		3	0.5	21.5
6.25	1	0.5	106.0	100.00	1	0.5	4.0
	2	0.5	101.5		2	0.5	2.5
	3	0.5	103.0		3	0.5	3.0

表 14 不同统计方法 EC₅₀ 及其 95%置信区间计算结果

计算方法	72 h EC ₅₀	95%置信区间
直线内插法	73.4%	68.0%~79.2%
非线性回归（逻辑斯蒂模型）	72.9%	68.2%~77.5%

综合上述标准和导则的有关说明以及计算实证，本标准规定可采用直线内插法或非线性回归法计算 EC₅₀，其中直线内插法提供了计算示例，非线性回归法则以 GB/T 21805-2025 作为规范性引用文件。

5.11 质量保证和质量控制

5.11.1 参比物测定

参比物试验可用于反映受试生物的敏感性，并为判断实验室测试体系是否有效提供重要信息。目前，国内外相关方法主要以 3,5-二氯苯酚和重铬酸钾作为参比物。其中，重铬酸钾属于易制爆危险化学品，也是一类致癌物。因此，从材料可获取性和保护人体健康的角度考虑，本标准只列 3,5-二氯苯酚作为参比物，并在标准条款 12.1 中规定了应在样品测试时或定期（每年至少 2 次）开展参比物试验，并规定了参比物试样组制备的方法。

5.11.2 试验的有效性判定

5.11.2.1 参比物结果的判定

除了 ISO 8692-2012 标准提供了参比物 72 h EC₅₀ 的实验室间比对结果（以均值、标准偏差和变异系数表示）作为参考外，包括 ISO 在内的相关标准均未给出判断试验是否有效的参比物测定结果的限值范围要求。考虑到本标准如无参比物测试结果的限值范围规定，对受试生物敏感性和实验室测试体系有效性的判定将缺少量化标准，可能导致监管尺度的不统一。本标准以 ISO 8692-2012 标准为主要编制依据，方法高度类同。因此，结合专家意见，综合本标准的实验室内、实验室间验证结果以及 ISO 比对结果，本标准确定参比物 3,5-二氯苯酚的 72 h EC₅₀ 限值范围为 2.00 mg/L~4.68 mg/L（见表 15）。其中，ISO 标准的浓度范围，则根据其提供的均值 3.38 mg/L 和标准偏差 1.30 mg/L，按较严格的 $\mu\pm\sigma$ 估计为 2.08 mg/L~4.68 mg/L。

表 15 参比物 3,5-二氯苯酚 72 h EC₅₀ 限值范围的确定

标准	验证/比对方式	实验室数量（个）	72 h EC ₅₀ （mg/L）	
ISO 8692-2012	实验室间	9	2.08~4.68	2.00~4.68
本标准	实验室内	1	3.15~3.29	
	实验室间	6	2.00~3.45	
注：ISO 标准的浓度范围按 $\mu\pm\sigma$ 估计。				

5.11.2.2 试验结果的判定

本标准条款主要参照了 ISO 8692-2012 标准条款 8 的相关规定：

如果满足以下条件，则认为试验有效：

- a) 对照组平均比生长率应至少为 1.4 d^{-1} 。对应于细胞密度在 72 小时内增加 67 倍。
- b) 对照组各平行之间的生长率变异系数不超过 5%。
- c) 试验期间，对照组 pH 值相对于生长培养基增加不超过 1.5 个 pH 单位。

同时，ISO 8692-2012 在其条款 9.1 生长曲线绘制中规定“在接近试验培养期结束时，如果对照组出现生长率显著下降，则受抑制的处理组可能会趋向于赶上对照，将错误地显示降低了的生长抑制作用。在这种情况下，应根据对照组指数生长期内的最后一次测定，计算生长率和生长抑制”。针对 ISO 标准缺少对照组比生长率在培养过程中可接受的下降水平阈值的问题，本标准参照了 GB/T 21805-2025 关于不同生长阶段比生长率变异的控制要求“试验各阶段，如 0 d~1 d、1 d~2 d 和 2 d~3 d，对照组各平行的不同阶段平均比生长率变异系数的平均值应不超过 35%”，在试验有效性判定中补充了相关条款。

5.12 试验报告

本标准条款参照 ISO 8692-2012 条款 10 的相关规定，试验报告应包括但不限于以下内容：

- a) 藻种名称、来源；
- b) 样品类型、来源、主要污染物组分（适用时）、保存方法及保存时间；
- c) 样品预处理方法，包括样品解冻、悬浮物去除和 pH 调节等信息；
- d) 测试开始和持续时间；
- e) 测试条件，包括测试温度、光照强度和三角瓶摇动方式等信息；
- f) 质量保证和质量控制要求的符合性；
- g) 测试结果 LID 或 72 h EC_{50} 及其计算方法、95%置信区间（适用时）；
- h) 藻细胞的其他可见效应。

5.13 附录

5.13.1 培养基制备

附录 A 培养基制备为规范性附录，参考 ISO 8692-2012、OECD TG 201-2006 编写。

5.13.2 藻种保藏和贮备培养

附录 B 藻种保藏和贮备培养为规范性附录。关于受试藻种的保藏和贮备培养，ISO 8692-2012 表述较为模糊，在其条款 5.1 中指出：

藻种可在培养基中培养，每周转接一次，以维持良好生长，培养可以持续更长时间以获得更多藻种，藻种也可以在琼脂平板上或藻酸盐微珠中保存几个月，而不会失去活力，当需要开展毒性试验时，藻类易于从琼脂或培养基中取出，通过显微镜观察确认生长情况。

在《化学品测试方法 生物系统效应卷》（中国环境出版社，2013）中，藻种的保藏和贮备培养方法参照了 OECD TG 201-2006，但表述得更为具体：

藻种可在试管内固体培养基斜面上保存。在培养基中加入 0.8% 的琼脂，灭菌后倒入试管，冷却成斜面，然后接种藻类，棉塞封闭，在较低的光照和温度条件下可保存较长时间。大约每隔 2 个月转接一次。如果经常开展试验，藻种应在液体培养基中贮备培养。在三角瓶中加入约 100 mL 培养基，接种藻类，在 20 °C 持续光照的条件下培养，7 d 转接一次，以保持藻种生长良好，随时有足够的数量可用于试验。应经常检查贮备培养中藻种的生长情况，一般进入停滞生长期时应转接培养，有畸形生长或受到其他藻类或细菌污染时应废弃或采取纯化、复壮等措施。

而 EPA-821-R-02-013-2002 则给出了使用液体培养基低温避光的保藏方法，贮备培养则在试验相同的温光条件下进行，在其条款 14.6.16.3.2 中规定：

收到起始培养物（通常约 10 mL）后，通过无菌操作取 1 mL 接种至含有培养基的培养瓶中，以启动贮备培养物的制备。最初制备的贮备培养基体积取决于后续从贮备培养物中接种的试验瓶数量或其他计划用途，体积范围可从 125 mL 烧瓶装 25 mL 培养基到 4 L 烧瓶装 2 L 培养基。起始培养物的剩余部分可在 4 °C 的冰箱中（避光）保存长达六个月。

关于实验室扩繁的藻种的保藏，EPA-821-R-02-013-2002 也在其条款 14.6.16.3.5 中指出“有活力的单藻培养物若置于 4 °C 冰箱中，可长时间保存”。

另外，国内标准 NY/T 4195.6-2022 也在其条款 6.1.1.4 中指出“进行长期保种时，将处于对数生产期的藻培养液在 0 °C~8 °C 条件下冷藏、避光保存，每半年转接 1 次”。

鉴于琼脂斜面和藻酸盐微珠的藻种保藏方法较为复杂且在国内较少采用的现状，本标准藻种采用液体培养基进行保藏，具体参照 NY/T 4195.6-2022 标准和 EPA-821-R-02-013-2002 方法，贮备培养则参照《化学品测试方法 生物系统效应卷》及 OECD TG 201-2006 方法。

6 方法验证

6.1 实验室内验证

6.1.1 空白对照验证

分别采用机械持续摇动和人工定时摇动 2 种试验培养方式，在相同培养温度和光照条件下对空白对照各进行了 6 次重复试验验证。结果表明，2 种培养方式藻类平均比生长率、平行间变异系数和相较于培养基的 pH 值升高均满足方法质控要求（见表 16）。相比较下，机械持续摇动下的藻类平均比生长率显著高于人工定时摇动，而平行间变异系数和 pH 值升高则总体小于人工定时摇动。

表 16 空白对照实验室内 6 次独立试验结果

机械持续摇动				人工定时摇动			
实验批次	平均比生长率 (μ , d ⁻¹)	平行间比生长 率变异系数	pH 值 变化	实验批次	平均比生长率 (μ , d ⁻¹)	平行间比生长 率变异系数	pH 值 变化
X ₁	1.85	1.06%	0.31	X ₁	1.48	2.14%	0.51
X ₂	1.89	1.09%	0.22	X ₂	1.52	1.58%	0.43
X ₃	1.85	0.97%	0.28	X ₃	1.55	1.52%	0.29

机械持续摇动				人工定时摇动			
实验批次	平均比生长率 (μ , d ⁻¹)	平行间比生长 率变异系数	pH 值 变化	实验批次	平均比生长率 (μ , d ⁻¹)	平行间比生长 率变异系数	pH 值 变化
X_4	1.85	0.91%	0.35	X_4	1.57	2.39%	0.55
X_5	1.88	0.98%	0.21	X_5	1.57	1.13%	0.47
X_6	1.85	0.80%	0.42	X_6	1.56	1.19%	0.12
\bar{X}	1.86	0.97%	0.30	\bar{X}	1.54	1.66%	0.40
S	0.02	0.11%	0.08	S	0.04	0.51%	0.16
RSD	0.9%	10.9%	26.8%	RSD	2.3%	30.6%	40.9%

6.1.2 参比物验证

对标准所规定的参比物 3,5-二氯苯酚开展了 6 次重复试验验证,同时对重铬酸钾也作了验证,结果见表 17。6 次独立试验结果显示,3,5-二氯苯酚和重铬酸钾 72 h EC₅₀ 分别在 3.15 mg/L~3.29 mg/L 之间和 1.06 mg/L~1.14 mg/L 之间,均值分别为 3.21 mg/L 和 1.10 mg/L。

表 17 参比物实验室内 6 次独立试验结果

样品	试验次数	浓度 (mg/L)	抑制率		
			\bar{X}_i	S_i	RSD _i
3,5 二氯苯酚	6	4.00	107.2%	5.0%	4.7%
		3.48	70.5%	3.0%	4.3%
		3.02	34.8%	3.1%	8.8%
		2.63	21.1%	3.9%	18.4%
		2.29	12.3%	3.6%	29.3%
		1.99	3.6%	3.1%	86.0%
		72 h EC ₅₀	3.21	0.05	1.6%
重铬酸钾	6	1.44	71.3%	1.9%	2.6%
		1.2	58.4%	3.4%	5.8%
		1	40.1%	1.7%	4.2%
		0.83	23.0%	4.4%	19.3%
		0.69	13.3%	3.4%	25.4%
		0.58	4.8%	2.6%	54.5%
		72 h EC ₅₀	1.10	0.02	2.2%

6.1.3 实际样品验证

对地表水、地下水、城镇污水、化工废水、制药废水、农药废水和电镀废水等 11 个不同来源的实际样品分别开展了 6 次独立试验,结果见表 18。其中城镇污水 2 和化工废水 1 的 LID 标准偏差均为 1.1,其余样品 LID 的标准偏差均为 0。

表 18 样品实验室内 6 次独立试验结果

样品	试验次数	稀释倍数	抑制率		
			\bar{X}_i	S_i	RSD _i
地表水	6	1	-2.6%	0.8%	-29.7%
		2	-1.2%	0.9%	-77.6%
		3	-1.2%	1.2%	-39.2%
		LID	1.0	0	0
地下水	6	1	-2.8%	1.5%	-51.5%
		2	-1.9%	0.5%	-27.0%
		3	-1.4%	1.1%	-24.9%
		LID	1.0	0	0
城镇污水 1	6	1	47.8%	3.7%	7.7%
		2	8.7%	2.2%	25.4%
		3	0	1.1%	/ ^a
		LID	3.0	0	0
城镇污水 2	6	1	65.9%	4.4%	6.6%
		2	44.8%	4.0%	9.0%
		3	17.1%	3.1%	18.0%
		4	11.0%	2.2%	20.4%
		6	5.1%	2.1%	41.4%
		8	2.1%	1.5%	73.6%
		LID	7.0	1.1	15.6%
化工废水 1	6	1	97.4%	4.4%	4.6%
		2	62.4%	5.1%	8.2%
		3	24.6%	7.1%	29.0%
		4	13.2%	4.1%	31.2%
		6	3.9%	2.2%	55.9%
		LID	5.0	1.1	15.6%
化工废水 2	6	1	57.8%	1.4%	2.4%
		2	23.6%	2.3%	9.8%
		3	6.9%	1.3%	19.0%
		4	1.2%	0.6%	51.5%
		LID	4.0	0	0
制药废水 1	6	1	39.2%	3.6%	9.2%
		2	5.0%	2.0%	41.1%
		3	0.1%	2.1%	/ ^a
		LID	2.7	0.5	19.4%
制药废水 2	6	1	25.4%	2.0%	8.0%
		2	-2.3%	0.9%	-39.1%
		3	-2.8%	1.6%	-56.7%
		LID	2.0	0	0
农药废水 1	6	1	62.5%	1.2%	1.9%

样品	试验次数	稀释倍数	抑制率		
			\bar{X}_i	S_i	RSD _i
		2	54.3%	1.4%	2.5%
		3	44.3%	3.3%	7.4%
		4	30.8%	4.0%	12.8%
		6	3.4%	1.5%	44.6%
		LID	6.0	0	0
农药废水 2	6	1	17.2%	3.1%	18.1%
		2	2.1%	1.4%	66.0%
		3	1.3%	1.0%	82.1%
		LID	2.0	0	0
电镀废水	6	8	111.8%	3.8%	3.4%
		12	91.8%	6.1%	6.6%
		16	13.8%	3.0%	21.6%
		24	1.1%	0.7%	64.0%
		32	-1.9%	1.4%	-74.6%
		LID	24.0	0	0
a 因均值接近于零, 不计算 RSD					

6.2 实验室间验证

6.2.1 验证方案

按照《环境监测分析方法标准制订技术导则》（HJ 168-2020）的规定，组织了 6 家单位开展方法的实验室间验证，主要验证内容为方法有效性、敏感性及精密度。验证方案通过组织参与标准开题论证的评审专家召开线上咨询会的形式，经论证后确定。

6.2.1.1 参与验证实验室

参与验证的 6 家实验室包括生态环境部南京环境科学研究所、天津市生态环境监测中心、甘肃省陇南生态环境监测中心、江苏省常州环境监测中心、广西壮族自治区生态环境监测中心和广东省科学院微生物研究所（广东省微生物分析检测中心），地域上兼顾东西部、南北方，涵盖部属科研单位、省市环境监测站以及第三方检测机构等不同级别（见表 19）。其中生态环境部南京环境科学研究所、广东省科学院微生物研究所（广东省微生物分析检测中心）为新化学品和农药登记生态毒理学试验单位，常州市生态环境监测中心等其他单位也具有丰富的藻、溞、鱼等毒理学测试经验和（或）CMA 资质。

表 19 方法验证单位一览表

验证单位	单位性质	任务分工
------	------	------

验证单位	单位性质	任务分工
生态环境部南京环境科学研究所	部属科研单位	方法验证
天津市生态环境监测中心	省级环境监测站	方法验证
甘肃省陇南生态环境监测中心	市级环境监测站	方法验证
江苏省常州环境监测中心	市级环境监测站	方法验证
广西壮族自治区生态环境监测中心	省级环境监测站	方法验证
广东省科学院微生物研究所（广东省微生物分析检测中心）	第三方检测机构	方法验证

6.2.1.2 验证内容

6.2.1.2.1 方法有效性及敏感性验证

验证样品为 3,5-二氯苯酚（参比物），各实验室均重复测定 6 次，计算 72 h EC₅₀、95% 置信限及 72 h EC₅₀ 的范围。同时计算空白对照组平均藻类比生长率、各平行间的比生长率变异系数、各阶段的比生长率变异系数、试验过程中 pH 变化等范围，并检验是否符合质控要求。

6.2.1.2.2 方法精密度验证

验证样品包括地表水（某城市内河地表水）、地下水（某化工园区监测井地下水）、生活污水（某城镇污水处理厂排放口出水）、工业废水（某工业园区污水处理厂收集池废水）等 4 个样品。样品由浙江省生态环境监测中心采集后装于聚乙烯袋，袋上注明样品编号，每种样品 30 L，2℃~8℃ 避光运输至浙江省生态环境监测中心分装，于-18℃ 冻结后经冷链发送至各验证实验室。各验证实验室进行最低无效应稀释倍数（LID）和 EC₅₀ 的测定，每个样品均测定 6 次，分别计算 LID 和 72 h EC₅₀，及其均值、标准偏差、相对标准偏差。

6.2.2 主要验证过程

在方法验证前，通过召开视频会并组织人员赴现场培训以及模拟试验等方式，使参加验证的操作人员熟悉和掌握方法原理、操作流程及质控要点，确保方法验证过程中所用的试剂材料、仪器设备及分析步骤等符合方法相关要求，验证数据和验证报告能够按时提交。验证单位根据验证方案开展实验。验证过程中遇到问题及时沟通和解决。编制组最终将方法验证的结果进行汇总及统计分析，并编制验证报告（详见附件）。

6.2.3 验证结果

6.2.3.1 方法有效性及敏感性

6 家实验室对方法的有效性、敏感性进行验证，使用参比物 3,5-二氯苯酚各分别测定 6 次。整个测试期间，空白对照组的平均比生长率在 1.47 d⁻¹~1.78 d⁻¹ 之间，相当于藻类细胞密度增加 81.3 倍~207.5 倍，符合“空白对照组平均比生长率至少为 1.4 d⁻¹，相当于在 72 h 试验期内，对照组藻类细胞密度应至少增加 67 倍”的质控要求（见表 20）。整个测试期间，空白对照组各平行的比生长率变异系数在 0.4%~3.6% 之间，符合“整个测试期间，空白对照组各平行的比生长率变异系数≤5%”的质控要求（见表 21）。测试各阶段（0 d~1 d、1 d~

2 d 和 2 d~3 d)，空白对照组各平行不同测试阶段的比生长率变异系数的均值在 7.5%~32.8%之间，符合“各平行的不同阶段比生长率变异系数的平均值 $\leq 35\%$ ”的质控要求（见表 22）。整个测试期间，空白对照组相对于培养基的 pH 值升高在 0.12~1.08 之间，符合“相对于藻类培养基，空白对照组 pH 值升高 ≤ 1.5 个单位”的质控要求（见表 23）。反映藻类敏感性的参比物 3,5-二氯苯酚 72 h EC_{50} 在 2.00 mg/L~3.45 mg/L 之间（见表 24）。

表 20 空白对照组整个测试期间各平行的平均比生长率验证结果 (d^{-1})

实验室 L	试验号 T						范围	结论
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆		
L ₁	1.54	1.54	1.62	1.52	1.55	1.56	1.52~1.62	空白对照组各平行的平均比生长率在 1.47 d^{-1} ~1.78 d^{-1} 之间，均符合大于 1.4 d^{-1} 的质控要求
L ₂	1.57	1.59	1.47	1.56	1.50	1.53	1.47~1.59	
L ₃	1.71	1.69	1.60	1.72	1.67	1.65	1.60~1.72	
L ₄	1.59	1.57	1.61	1.60	1.64	1.58	1.57~1.64	
L ₅	1.76	1.67	1.78	1.77	1.60	1.75	1.60~1.78	
L ₆	1.72	1.58	1.64	1.63	1.61	1.69	1.58~1.72	

表 21 空白对照组整个测试期间各平行的比生长率变异系数验证结果 (%)

实验室 L	试验号 T						范围	结论
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆		
L ₁	1.90	0.41	2.12	1.06	1.36	1.74	0.41~1.90	空白对照组各平行的比生长率变异系数在 0.4%~3.6% 之间，均符合 $\leq 5\%$ 的质控要求
L ₂	1.31	2.40	1.16	1.09	0.81	1.86	0.81~2.40	
L ₃	1.73	2.06	0.78	1.42	1.56	1.94	0.78~2.06	
L ₄	2.12	1.66	2.00	1.76	0.82	1.85	0.82~2.12	
L ₅	3.31	2.07	1.58	1.97	2.02	3.60	1.58~3.60	
L ₆	1.69	2.47	0.70	1.07	1.58	1.33	0.70~2.47	

表 22 空白对照组各平行的不同测试阶段比生长率变异系数的均值验证结果 (%)

实验室 L	试验号 T						范围	结论
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆		
L ₁	26.7	30.4	27.7	21.4	19.3	12.1	12.1~30.4	空白对照组各平行的不同测试阶段比生长率变异系数的均值在 7.5%~32.8% 之间，均符合 $\leq 35\%$ 的质控要求
L ₂	24.3	21.1	7.5	21.6	26.5	14.0	7.5~26.5	
L ₃	20.0	22.0	24.6	18.8	21.3	17.4	17.4~24.6	
L ₄	28.1	11.4	25.2	25.6	24.3	32.8	11.4~32.8	
L ₅	19.6	11.9	23.7	14.7	17.1	18.1	11.9~23.7	
L ₆	19.9	27.6	20.0	24.1	25.0	16.2	16.2~27.6	

表 23 空白对照组相对于藻类培养基 pH 值升高验证结果

实验室 L	试验号 T	范围	结论
-------	-------	----	----

	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆		
L ₁	0.81	0.77	0.70	0.65	0.58	0.51	0.51~0.81	空白对照组 pH 值升高在 0.12~1.08 之间, 均满足 ≤1.5 的质控要求
L ₂	0.72	0.67	0.55	0.42	0.32	0.21	0.21~0.72	
L ₃	1.08	1.05	0.98	0.92	0.86	0.80	0.80~1.08	
L ₄	0.65	0.58	0.49	0.40	0.20	0.12	0.12~0.65	
L ₅	1.00	0.92	0.84	0.75	0.62	0.55	0.55~1.00	
L ₆	0.96	0.86	0.78	0.69	0.63	0.56	0.56~0.96	

表 24 参比物 EC₅₀测定验证结果 (mg/L)

实验室 L	指标	试验号 T						72 h EC ₅₀ 范围
		T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	
L ₁	72 h EC ₅₀	2.93	2.00	2.10	2.29	2.64	3.44	2.00~3.45
	95%置信区间	2.51~ 3.56	1.46~ 3.33	1.12~ 3.05	2.03~ 2.66	2.32~ 3.05	2.17~ 5.44	
L ₂	72 h EC ₅₀	2.08	2.41	2.79	2.33	2.57	2.00	
	95%置信区间	2.04~ 2.12	2.35~ 2.47	2.75~ 2.82	2.27~ 2.40	2.53~ 2.61	1.97~ 2.04	
L ₃	72 h EC ₅₀	2.80	2.17	2.23	3.29	2.04	2.27	
	95%置信区间	2.76~ 2.84	2.12~ 2.21	2.20~ 2.27	3.26~ 3.33	2.00~ 2.08	2.23~ 2.31	
L ₄	72 h EC ₅₀	2.16	2.10	2.63	2.68	2.19	2.26	
	95%置信区间	2.10~ 2.21	2.08~ 2.13	2.59~ 2.67	2.56~ 2.80	2.14~ 2.23	2.17~ 2.34	
L ₅	72 h EC ₅₀	2.67	2.50	2.17	3.45	2.15	2.53	
	95%置信区间	2.61~ 2.73	2.47~ 2.53	2.13~ 2.22	3.38~ 3.52	2.08~ 2.22	2.49~ 2.56	
L ₆	72 h EC ₅₀	2.18	3.18	2.19	2.15	2.69	2.43	
	95%置信区间	2.16~ 2.20	3.03~ 3.34	2.15~ 2.23	2.08~ 2.22	2.61~ 2.77	2.41~ 2.46	

6.2.3.2 方法精密度

6 家实验室分别对地表水样品测定 6 次, LID 均为 1, 72 h EC₅₀ 均大于 100% (见表 25)。LID 实验室内相对标准偏差、实验室间相对标准偏差均为 0 (见表 26)。

表 25 地表水样品测定结果

实验室 L	测试终点	试验号 T					
		T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆
L ₁	LID	1	1	1	1	1	1
	72 h EC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
L ₂	LID	1	1	1	1	1	1

实验室 L	测试终点	试验号 T					
		T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆
	72 h EC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
L ₃	LID	1	1	1	1	1	1
	72 h EC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
L ₄	LID	1	1	1	1	1	1
	72 h EC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
L ₅	LID	1	1	1	1	1	1
	72 h EC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
L ₆	LID	1	1	1	1	1	1
	72 h EC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%

表 26 地表水样品 LID 测定精密度验证结果

实验室 L	试验号 T						\bar{X}_i	S_i	RSD _i
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆			
L ₁	1	1	1	1	1	1	1.0	0	0
L ₂	1	1	1	1	1	1	1.0	0	0
L ₃	1	1	1	1	1	1	1.0	0	0
L ₄	1	1	1	1	1	1	1.0	0	0
L ₅	1	1	1	1	1	1	1.0	0	0
L ₆	1	1	1	1	1	1	1.0	0	0
\bar{X}_T	1.0								
S'	0								
RSD'	0								

注： \bar{X}_i 为第*i*个实验室测定结果的平均值； S_i 为第*i*个实验室测定结果的标准偏差；RSD_i为第*i*个实验室测定结果的相对标准偏差； \bar{X}_T 为所有实验室测定结果的平均值； S' 为实验室间标准偏差；RSD'为实验室间相对标准偏差。（下同）

6家实验室分别对地下水样品测定6次，LID为1~2，72 h EC₅₀均大于100%（见表27）。LID实验室内相对标准偏差分别为0、0、22.3%、22.3%、0、0，实验室间相对标准偏差为13.1%（见表28）。

表 27 地下水样品测定结果

实验室 L	测试终点	试验号 T					
		T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆
L ₁	LID	2	2	2	2	2	2
	72 h EC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
L ₂	LID	2	2	2	2	2	2
	72 h EC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
L ₃	LID	2	2	2	1	2	2

实验室 L	测试终点	试验号 T					
		T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆
	72 h EC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
L ₄	LID	2	2	1	2	2	2
	72 h EC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
L ₅	LID	2	2	2	2	2	2
	72 h EC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
L ₆	LID	2	2	2	2	2	2
	72 h EC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%

表 28 地下水样品 LID 测定精密度验证结果

实验室 L	试验号 T						\bar{X}_i	S_i	RSD _i
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆			
L ₁	2	2	2	2	2	2	2.0	0	0
L ₂	2	2	2	2	2	2	2.0	0	0
L ₃	2	2	2	1	2	2	1.8	0.4	22.3%
L ₄	2	2	1	2	2	2	1.8	0.4	22.3%
L ₅	2	2	2	2	2	2	2.0	0	0
L ₆	2	2	2	2	2	2	2.0	0	0
\bar{X}_T	1.9								
S'	0.3								
RSD'	13.1%								

6 家实验室分别对生活污水样品测定 6 次，LID 为 6~8，实验室内相对标准偏差分别为 14.1%、14.1%、14.1%、14.1%、14.1%、15.6%，实验室间相对标准偏差为 13.4%（见表 29）。72 h EC₅₀ 在 33.2%~54.0% 之间，实验室内相对标准偏差分别为 13.9%、8.0%、15.1%、16.5%、14.9%、16.3%，实验室间相对标准偏差为 16.7%（见表 30）。

表 29 生活污水样品 LID 测定精密度验证结果

实验室 L	试验号 T						\bar{X}_i	S_i	RSD _i
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆			
L ₁	8	6	8	6	8	8	7.3	1.0	14.1%
L ₂	8	6	8	8	8	6	7.3	1.0	14.1%
L ₃	6	8	8	8	6	8	7.3	1.0	14.1%
L ₄	8	6	6	8	8	8	7.3	1.0	14.1%
L ₅	8	8	6	8	8	6	7.3	1.0	14.1%
L ₆	8	6	8	6	6	8	7.0	1.1	15.6%
\bar{X}_T	7.3								
S'	1.0								
RSD'	13.4%								

表 30 生活污水样品 EC₅₀测定精密度验证结果 (%)

实验室 L	指标	试验号 T						\bar{X}_i	S_i	RSD _i
		T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆			
L ₁	72 h EC ₅₀	46.8	53.9	35.4	47.7	52.0	44.8	46.8	6.5	13.9
	95%置信区间	39.0~ 54.6	45.2~ 62.6	24.0~ 46.8	41.3~ 54.2	38.5~ 65.4	40.0~ 50.0	—	—	—
L ₂	72 h EC ₅₀	51.3	42.4	48.3	50.2	54.0	51.5	49.6	4.0	8.0
	95%置信区间	35.1~ 67.5	37.1~ 47.8	39.8~ 57.0	40.9~ 59.3	38.3~ 69.8	44.3~ 58.6	—	—	—
L ₃	72 h EC ₅₀	48.3	33.7	35.7	36.0	42.2	33.9	38.3	5.8	15.1
	95%置信区间	39.9~ 56.7	22.0~ 45.5	27.0~ 44.4	28.2~ 43.7	35.5~ 49.0	24.5~ 43.3	—	—	—
L ₄	72 h EC ₅₀	46.4	40.9	51.3	33.8	35.3	47.3	42.5	7.0	16.5
	95%置信区间	39.0~ 53.8	35.8~ 46.0	42.1~ 60.4	22.3~ 45.2	27.0~ 43.5	39.3~ 55.3	—	—	—
L ₅	72 h EC ₅₀	33.4	34.6	47.7	34.3	36.1	42.2	38.1	5.7	14.9
	95%置信区间	22.8~ 43.9	23.5~ 45.6	40.9~ 54.4	25.9~ 42.8	26.8~ 45.4	35.9~ 48.6	—	—	—
L ₆	72 h EC ₅₀	33.2	48.0	35.3	47.3	38.9	35.1	39.6	6.5	16.3
	95%置信区间	25.2~ 41.2	41.5~ 54.5	27.6~ 43.0	39.4~ 55.1	33.8~ 44.1	27.6~ 42.6	—	—	—
\bar{X}_T	72 h EC ₅₀	42.5								
S'		7.1								
RSD'		16.7								

6家实验室分别对工业废水样品测定6次，LID为24~32，实验室内相对标准偏差分别为12.9%、0、0、15.5%、12.9%、15.6%，实验室间相对标准偏差为12.6%（见表31）。72 h EC₅₀在4.4%~6.1%之间，实验室内相对标准偏差分别为8.4%、6.1%、8.1%、8.3%、8.2%、12.4%，实验室间相对标准偏差为8.5%（见表32）。

表 31 工业废水样品 LID 测定精密度验证结果

实验室 L	试验号 T						\bar{X}_i	S_i	RSD _i
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆			
L ₁	24	24	24	24	24	32	25.3	3.3	12.9%
L ₂	24	24	24	24	24	24	24.0	0	0
L ₃	24	24	24	24	24	24	24.0	0	0
L ₄	24	32	24	24	24	32	26.7	4.1	15.5%
L ₅	24	32	24	24	24	24	25.3	3.3	12.9%
L ₆	32	32	24	24	24	32	28.0	4.4	15.6%
\bar{X}_T	25.6								

实验室 L	试验号 T						\bar{X}_i	S_i	RSD _i
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆			
S'	3.2								
RSD'	12.6%								

表 32 工业废水样品 EC₅₀测定精密度验证结果 (%)

实验室 L	指标	试验号 T						\bar{X}_i	S_i	RSD _i
		T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆			
L ₁	72 h EC ₅₀	5.36	5.35	5.46	5.18	6.00	4.62	5.33	0.45	8.4
	95%置信区间	5.32~ 5.40	5.31~ 5.39	5.29~ 5.62	5.15~ 5.22	5.96~ 6.03	4.45~ 4.79	—	—	—
L ₂	72 h EC ₅₀	5.08	5.68	5.07	5.10	5.31	5.80	5.34	0.32	6.1
	95%置信区间	5.05~ 5.10	5.64~ 5.71	4.92~ 5.22	5.07~ 5.13	5.25~ 5.38	5.78~ 5.82	—	—	—
L ₃	72 h EC ₅₀	5.59	6.06	5.20	5.50	5.28	4.75	5.40	0.44	8.1
	95%置信区间	5.50~ 5.67	6.02~ 6.10	5.18~ 5.23	5.37~ 5.64	5.24~ 5.32	4.66~ 4.85	—	—	—
L ₄	72 h EC ₅₀	5.75	4.81	5.76	5.12	5.30	4.78	5.25	0.44	8.3
	95%置信区间	5.70~ 5.80	4.70~ 4.92	5.60~ 5.92	5.05~ 5.19	5.26~ 5.35	4.58~ 4.97	—	—	—
L ₅	72 h EC ₅₀	5.55	4.69	5.58	5.68	5.91	5.92	5.55	0.45	8.2
	95%置信区间	5.53~ 5.56	4.65~ 4.73	5.56~ 5.59	5.55~ 5.81	5.80~ 6.03	5.85~ 6.00	—	—	—
L ₆	72 h EC ₅₀	4.53	4.72	5.72	5.85	5.44	4.41	5.11	0.63	12.4
	95%置信区间	4.43~ 4.62	4.60~ 4.84	5.66~ 5.78	5.74~ 5.96	5.30~ 5.57	4.33~ 4.50	—	—	—
\bar{X}_T	72 h EC ₅₀	5.33								
S'		0.45								
RSD'		8.5								

7 与开题报告的差异说明

编制组经研究讨论，标准文本和编制说明落实开题论证会的专家意见。

(1) 明确使用近头状尖胞藻（羊角月牙藻）作为受试生物，标准名称修改为《水质 急性毒性的测定 近头状尖胞藻生长抑制试验》，与即将发布的排放标准做好衔接，进一步完善说明。

受试生物和标准名称按意见进行了修改，并在编制说明中作了更为详细的说明。

(2) 完善相关术语定义，补充引用规范性文件。

删除了生物量的术语定义，其他术语中有关生物量的表述改为了细胞密度。最低无效应稀释倍数、半数效应浓度的定义由原通用定义加本标准特殊性注解改为按本标准直接进行定义。补充了浮游植物计数等引用规范性文件。

(3) 比较说明各类毒性试验方法的特点，进一步说明制订该方法标准的必要性；按意见进行了补充说明。

(4) 明确藻类生物量测定采用显微镜计数法。

标准文本明确了藻类生物量测定采用显微镜计数法，同时删除了有关荧光法、电子颗粒计数法等其他生物量测定替代方法的表述。

(5) 进一步细化和规范标准文本。

根据试验流程，将受试生物纳入“5 试剂和材料”条款中，并另起“7 预培养”条款，补充了培养条件。同时，在“6 仪器和设备”条款中补充了样品分装瓶/袋等，附录 B 中细化了藻种的保藏和贮备培养方法，重新组织标准文本中的部分语言，使表述更易于理解。

8 第一次征求意见稿技术审查会专家意见和修改情况

编制组针对第一次标准征求意见稿技术审查会专家组意见和与会各位专家的个人意见，在标准文本和编制说明相应部分逐一做出修改和完善，见表 33。

表 33 第一次征求意见稿技术审查会专家意见和修改情况汇总表

来源	意见	修改情况
专家组	1. 规范文本表述，调整部分条款顺序，完善样品采集和预处理过程、试样组制备、质量保证和质量控制等内容的文本表述，尽量做到准确、明确、具可操作性。	已按专家意见重新调整部分条款顺序，完善样品采集（见标准文本 8.1）和预处理过程（见标准文本 8.3）、试样组制备（见标准文本 9.1 和 9.2）、质量保证和质量控制（见标准文本 12）等内容。
	2. 明确 EC ₅₀ 计算方法，增加示例说明。	已经按照专家意见补充计算示例，见标准文本附录 C。
	3. 根据标准文本修改情况相应修改完善编制说明。	已按照标准文本的顺序，逐条修改完善编制说明。
	4. 按照《环境监测分析方法标准制订技术导则》（HJ 168-2020）和《环境保护标准编制出版技术指南》（HJ 565-2010）对标准文本和编制说明进行编辑性修改。	已按照 HJ 168 和 HJ 565 修改编制说明。
专家 1	1. 编制说明中试剂和材料等参照 ISO 方法、HJ 1069 等要求的应详细写明其合理性。	已在编制说明章节 5.5.1.2 中补充合理性分析。
	2. 编制说明中完善自动和手工振荡等效采用的理由。	自动和手工振荡的空白对照组比生长率均能达到质控要求，且用于确定 LID 和 EC ₅₀ 的抑制率均是通过比较对照后获得，二种振荡方式在 EPA 和 ASTM 等国际标准中均被采用。已在编

来源	意见	修改情况
		制说明章节 5.7 中补充理由。
	3. 核实 LID 的相对标准偏差的计算方法。	LID作为非连续型数据不适合取对数后计算相对标准偏差，如LID均为1时，取对数后无法计算。故相对标准偏差维持现计算方法。
	4. 明确 EC ₅₀ 计算方法,增加示例说明。	已经按照专家意见补充计算示例，见标准文本附录C。
	5. 完善文本的表述，尽量做到明确且具可操作性。	已按照专家意见逐条修改文本的表述，尽可能做到明确且具有可操作性。
专家 2	1. 与现行或在研毒性标准做好衔接，能保持一致的应尽量统一。	已按照专家意见进行衔接。如样品采集方法、样品运输和样品保存均参照了ISO标准要求，并与现行标准HJ 1069-2019 保持一致；LID测试的样品稀释系列设置与现行标准HJ 1069-2019，以及斑马鱼法、大型蚤法等 在研毒性标准保持统一。
	2. 进一步明确并完善干扰消除、样品采集和预处理环节的关键技术内容,如大颗粒过筛自然沉降、离心等方法，在对应章节修改、完善。	已按专家意见针对不同的采样、预处理和培养条件对试验结果的影响等，逐条分析消除影响的方式。
	3. 9.2.2 及 10.9 中规定了试验周期中需对 TOC 和 COD 进行测定，但缺乏控制要求，操作意义不明确，如非必要建议删掉，如需保留应明确必要的有效性控制要求。	样品保存时间与ISO标准保持一致，且编制组开展了样品保存时间的相关试验，因此删除了原标准文本中TOC和COD测试相关内容。
	4. 结果计算和表示中，进一步确认数据计算方法。如 EC ₅₀ 计算时采用非线性模型分析应进一步完善方法要求，补充必要的方法案例附录。	已经按照专家意见确认计算方法，参照GB/T 21805 相关规定选用适当的非线性回归方法计算，见标准文本 10.4；补充计算示例，见标准文本附录C。
	5. 10.3 中受试生物 的敏感性和测试体系有效性测定内容，不属于单次样品分析必需过程步骤，属于质量保证和质量控制要求，应放到对应章节。	已按照专家意见将受试生物的敏感性和测试体系有效性内容在标准文本 12.1 和 12.2 部分表述。
	6. 进一步规范文本表述和试样配制表格形式，简洁清晰、避免歧义。	已按专家意见，重新规范试样配制表格形式。
专家 3	1. 光照强度变异系数是近头状尖胞藻生长抑制测试中一个至关重要的质量控制参数，建议增加到标准文本的质量保证和质量控制中去。	光照强度的要求在 9.5.1 光照条件部分说明，要求各三角瓶之间液面高度处的光照强度变异系数应不超过 10%。
	2. EC ₅₀ 的计算，要提供示例说明模型的适应性。	已经按照专家意见确认计算方法，参照GB/T 21805 相关规定选用适当的非线性回归方法计算，见标准文本 10.4；补充计算示例，见标准文本附录C。
专家 4	1. 水样采集过程中需要明确采样过程和预处理技术，尤其需要添加大颗粒物	已按专家意见补充采样时使用筛网去除大颗粒物的内容。

来源	意见	修改情况
	需用网去除。	
	2. 水样体积不小于 4 L，且应该有重复样。	生物毒性监测采样量大，ISO、USEPA和其他国家标准中均无采集重复样品的要求。
	3. 参比物实验改到应在质控中。	已按照专家意见将参比物实验改到标准文本 12.1 和 12.2 部分质控部分中。
	4. 据计算中需明确计算方法，尤其是原有回归法应作为主导方法。	已经按照专家意见确认计算方法，参照GB/T 21805 相关规定选用适当的非线性回归方法计算，见标准文本 12.1；补充计算示例，见标准文本附录C。
	5. 标准中一些词语“宜”删去或改正。进一步完善和明确文本文字表述。	已按专家意见修改文字表述。
专家 5	1. 进一步优化完善关于采样瓶/袋的要求。	已在编制说明中完善了采样瓶/袋材质的选择依据，明确所参照标准。
	2. 全面梳理编制说明与标准文稿，令编制说明对标准文稿的各项内容起到充分的支撑作用。	已按专家意见补充修编编制说明与标准文稿。

9 第二次征求意见稿技术审查会专家意见和修改情况

编制组针对第二次标准征求意见稿技术审查会专家组意见，在标准文本和编制说明相应部分逐一做出修改和完善，见表 34。

表 34 第二次征求意见稿技术审查会专家意见和修改情况汇总表

来源	意见	修改情况
专家组	1. 按照修改的标准文本（3.3 和 8.3.2.2）进一步补充完善编制说明。	已按专家意见，针对标准文本 3.3 和 8.3.2.2，在编制说明中分别补充完善了“理想条件”的说明和地表水样品采取过滤处理的主要目的。
	2. 按照《环境监测分析方法标准制订技术导则》（HJ 168-2020）和《环境保护标准编制出版技术指南》（HJ 565-2010）对标准文本和编制说明进行编辑性修改。	已按照HJ 168 和HJ 565 修改编制说明。

10 参考文献

- [1] HJ 168-2020. 环境监测分析方法标准制订技术导则[S]. 北京: 国家标准化管理委员会, 2020.
- [2] HJ 565-2010. 环境保护标准编制出版技术指南[S]. 北京: 国家标准化管理委员会, 2010.
- [3] 杜兵, 张彭义, 张祖麟, 等. 北京市某典型污水处理厂中内分泌干扰物的初步调查[J]. 环境科学, 2004, 25(1): 114-116.
- [4] 申荣艳, 骆永明, 章钢娅, 等. 长江三角洲地区城市污泥中多氯联苯和有机氯农药含量与组分研究[J]. 土壤, 2006, 38(5): 539-546.
- [5] 温智皓, 段艳平, 孟祥周, 等. 城市污水处理厂及其受纳水体中 5 种典型 PPCPs 的赋存特征和生态风险[J]. 环境科学, 2013, 34(3): 927-932.
- [6] YU J, HU J, TANAKA S, et al. Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) in sewage treatment plants[J]. Water Research, 2009, 43(9): 2399-2408.
- [7] BRACK W, AISSA S A, BACKHAUS T, et al. Effect-based methods are key. The European Collaborative Project SOLUTIONS recommends integrating effect-based methods for diagnosis and monitoring of water quality[J]. Environmental Sciences Europe, 2019, 31(10): 1-6.
- [8] EPA 821-B-00-004. Method guidance and recommendations for whole effluent toxicity (WET) testing[S]. 5th edn. Environmental Protection Agency, Washington, DC, 2000.
- [9] 余若祯, 穆玉峰, 王海燕, 等. 排水综合评价中的生物毒性测试技术[J]. 环境科学研究, 2014, 27(4): 390-397.
- [10] GB 21903-2008. 发酵类制药工业水污染物排放标准[S]. 北京: 国家标准化管理委员会, 2008.
- [11] GB 21904-2008. 化学合成类制药工业水污染物排放标准[S]. 北京: 国家标准化管理委员会, 2008.
- [12] GB 21905-2008. 提取类制药工业水污染物排放标准[S]. 北京: 国家标准化管理委员会, 2008.
- [13] GB 21906-2008. 中药类制药工业水污染物排放标准[S]. 北京: 国家标准化管理委员会, 2008.
- [14] GB 21907-2008. 生物工程类制药工业水污染物排放标准[S]. 北京: 国家标准化管理委员会, 2008.
- [15] GB 21908-2008. 混装制剂类制药工业水污染物排放标准[S]. 北京: 国家标准化管理委员会, 2008.
- [16] GB 39731-2020. 电子工业水污染物排放标准[S]. 北京: 国家标准化管理委员会, 2020.
- [17] GB 21523-2024. 农药工业水污染物排放标准[S]. 北京: 国家标准化管理委员会, 2024.
- [18] HJ 1069-2019. 水质 急性毒性的测定 斑马鱼卵法[S]. 北京: 国家标准化管理委员会, 2019.
- [19] GB/T 21805-2025. 化学品 藻类生长抑制试验[S]. 北京: 国家标准化管理委员会, 2025.

- [20] GB/T 31270.14-2025. 化学农药环境安全评价试验准则 第 14 部分：藻类生长抑制试验[S]. 北京：国家标准化管理委员会, 2025.
- [21] OECD Guidelines for the testing of chemicals. No. 201: Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test[S]. Paris: OECD, 2006.
- [22] ISO 8692-2012. Water quality — Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae[S]. Geneva, Switzerland: ISO, 2012.
- [23] ISO 14442-2006. Water quality-Guidelines for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waste water[S]. Geneva, Switzerland: ISO, 2006.
- [24] EPA-821-R-02-013. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms[S]. 5th edn. Environmental Protection Agency, Washington, DC, 2002.
- [25] ASTM E1218-04. Standard guide for conducting static toxicity tests with microalgae[S]. ASTM Committee, 2012.
- [26] EPS 1/RM/25. Biological test method growth inhibition test using a freshwater alga[S]. Environment, Canada 2007.
- [27] EN ISO 8692. Water quality - Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae[S]. European Union 2012.
- [28] DIN EN ISO 8692. Water quality - Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae[S]. Germany 2012.
- [29] DIN 38412-L-33. Determining the tolerance of green algae to the toxicity of waste water[S]. Germany 1991.
- [30] NF T90-304. Water quality - Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green[S]. France 2012.
- [31] BS EN ISO 8692. Water quality - Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae[S]. Britain 2012.
- [32] KS I ISO 8692. Water quality - Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae[S]. Republic of Korea 2014.
- [33] JIS K 0420-73-10-2000. Water quality - Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*[S]. Tokyo: JISC, 2000.
- [34] Appendix to MFE 80205. Freshwater algae (*Selenastrum capricornutum*) Chronic Toxicity Test Protocol[S]. New Zealand 1998.
- [35] 环境保护部化学品登记中心化学品测试方法编委会. 化学品测试方法 生物系统效应卷[M]. 北京：中国环境出版社, 2013.
- [36] 国家环境保护总局水和废水监测分析方法编委会. 水和废水监测分析方法（第四版增补版）[M]. 北京：中国环境出版社, 2016.

- [37] Krienitz L, Bock C, Nozaki H, et al. SSU rRNA gene phylogeny of morphospecies affiliated to the bioassay alga "selenastrum capricornutum" recovered the polyphyletic origin of crescent-shaped chlorophyta[J]. *Journal of Phycology*, 2011, 47(4): 880-893.
- [38] HJ 831-2022. 淡水生物水质基准推导技术指南[S]. 北京: 中华人民共和国生态环境部, 2022.
- [39] NY/T 4195.6-2022. 农药登记环境影响试验生物试材培养 第 6 部分: 近头状尖胞藻[S]. 北京: 国家标准化管理委员会, 2022.
- [40] HJ 1257-2022. 化学物质环境管理 化学物质测试术语[S]. 北京: 国家标准化管理委员会, 2022.
- [41] ISO 5667-16-2017. Water quality - Sampling - Part 16: Guidance on biotesting of samples [S]. Geneva, Switzerland: ISO, 2017.
- [42] HJ 91.2-2022. 地表水环境质量监测技术规范[S]. 北京: 国家标准化管理委员会, 2022.
- [43] HJ 164-2020. 地下水环境监测技术规范[S]. 北京: 国家标准化管理委员会, 2020.
- [44] HJ 91.1-2019. 污水监测技术规范[S]. 北京: 国家标准化管理委员会, 2019.
- [45] HJ 1216-2021. 水质 浮游植物的测定 0.1 ml 计数框-显微镜计数法[S]. 北京: 国家标准化管理委员会, 2021.
- [46] Heever J A V D, Grobbelaar J U. In vivo chlorophyll a fluorescence of selenastrum capricornutum as a screening bioassay in toxicity studies[J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1998, 35(2): 281-286.
- [47] 杨晓红, 涂曹, 黄茜, 等. 分光光度法与显微计数法测定微小绿藻生物量的比较研究 [J]. *西南大学学报: 自然科学版*, 2014, 36(8): 44-50.
- [48] HJ 897-2017. 水质 叶绿素 a 的测定 分光光度法[S]. 北京: 国家标准化管理委员会, 2017.
- [49] ASTM E2935-15. Standard Practice for Conducting Equivalence Testing in Laboratory Applications[S]. America 2015.
- [50] ISO/TS 20281:2006. Water quality — Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data[S]. US EPA 2006.
- [51] Noel, Zachary A., Jie Wang, and Martin I. Significant influence of EC50 estimation by model choice and EC50 type[J]. *Plant Disease*, 2018, 102(4): 708-714.

附件

方法验证报告

方法名称：水质 急性毒性的测定 近头状尖胞藻生长抑制试验

项目承担单位：浙江省生态环境监测中心

验证单位：生态环境部南京环境科学研究所、天津市生态环境监测中心、广西壮族自治区生态环境监测中心、江苏省常州环境监测中心、甘肃省陇南生态环境监测中心、广东省科学院微生物研究所（广东省微生物分析检测中心）

项目负责人及职称：周胜利 高级工程师

通讯地址：浙江省杭州市西湖区学院路 117 号 电话：13216116368

报告编写人及职称：周胜利 高级工程师

报告日期：2025 年 8 月 4 日

前 言

按照《环境监测分析方法标准制订技术导则》（HJ 168-2020）的规定，组织开展方法验证。方法验证方案于 2025 年 4 月 24 日召开会议经专家组论证后最终确定。主要验证内容为方法有效性、敏感性及精密度。参与本方法验证的 6 家实验室分别为：生态环境部南京环境科学研究所、天津市生态环境监测中心、甘肃省陇南生态环境监测中心、江苏省常州环境监测中心、广西壮族自治区生态环境监测中心、广东省科学院微生物研究所（广东省微生物分析检测中心）。

在方法验证前，通过召开视频会并组织人员赴现场培训以及模拟试验等方式，使参加验证的技术人员熟悉和掌握方法原理、操作流程及质控要点，确保方法验证过程中所用的试剂材料、仪器设备及分析步骤等符合方法相关要求。

用于验证的样品包括 3,5-二氯苯酚（参比物）、地表水（某城市内河地表水）、地下水（某化工园区监测井地下水）、生活污水（某城镇污水处理厂排放口出水）、工业废水（某工业园区污水处理厂集水池废水）。其中，水样由浙江省生态环境监测中心采集后装于聚乙烯袋，袋上注明样品编号，每种样品 30 L，2 °C~8 °C 避光运输至浙江省生态环境监测中心分装，于-18 °C 冻结后经冷链发送至各验证实验室。验证单位根据验证方案协调同步启动验证。编制组最终将方法验证的结果进行汇总及统计分析，并编制本验证报告。

A. 1 原始测试数据

A. 1. 1 参加验证实验室基本情况

附表 1 参加验证的技术人员情况登记表

姓名	职称	从事分析工作年限（年）	单位名称
吉贵祥	研究员	13	生态环境部南京环境科学研究所
郭利国	实习研究员	3	
卞少伟	高级工程师	13	天津市生态环境监测中心
赵修青	工程师	9	
杜海峰	高级工程师	13	甘肃陇南生态环境监测中心
赵裕鑫	高级工程师	13	
符永鹏	高级工程师	11	
李文敏	高级工程师	11	
任雷	高级工程师	10	
李芳霞	工程师	10	
沈伟	高级工程师	11	江苏省常州环境监测中心
沈丽娟	高级工程师	23	
叶开晓	高级工程师	17	广西壮族自治区生态环境监测中心
甘琳瑶	助理工程师	3	
许玉洁	工程师	10	广东省科学院微生物研究所（广东省微生物分析检测中心）
余明暄	助理工程师	12	

附表2 使用仪器情况登记表

仪器名称	厂家型号	性能状况	单位名称
振荡培养箱(摇床)	上海知楚/ZQZY-88BES	正常	生态环境部南京环境科学研究所
高压灭菌灭菌器	TOMY/SX-700	正常	
分光光度计	岛津/UV-2550	正常	
照度计	德图/Testo540	正常	
水质参数分析仪	哈希/HQ2200	正常	
硬度计	哈那/HI97735	正常	
生物显微镜	奥林巴斯/CX41	正常	
光照培养箱	宁波莱福/PGX-280A-12H	正常	
电子天平	梅特勒/MS105	正常	
超低温冰箱	青岛海尔/DW-86L388J	正常	天津市生态环境监测中心
pH计	梅特勒/SevenExcellence	正常	
电子天平	赛多利斯/QUINTIX224-1CN	正常	
高压蒸汽灭菌器	申安/ZY2019000111	正常	
低速离心机	雷勃尔/TY2014000095	正常	
光照培养箱	上海知楚/ZCLY-180N	正常	
摇床	润华/HY-8	正常	
生物显微镜	奥林巴斯/BX53	正常	
照度计	柯尼卡美能达/T-10A	正常	
冰箱	海尔/BCD-595WFPB	正常	甘肃陇南生态环境监测中心
pH计	Metrohm/781	正常	
电子天平	赛多利斯/BCE224-1CCN	正常	
高压蒸汽灭菌器	申安/LDZF-50L-I	正常	
台式低速离心机	东旺/DL-50	正常	
照度计	上海精密/ZDS-10W-2D	正常	
培养室	/	正常	
生物显微镜	蔡司/Axioscope5	正常	
冰箱	青岛海尔/DW-25L262	正常	
冰箱	青岛海尔/HYC-390(F)	正常	江苏省常州环境监测中心
pH计	梅特勒/S479-UMIX	正常	
电子天平	梅特勒/ME204E/02	正常	
高压蒸汽灭菌器	山东新华/LMQC-80E	正常	
低速离心机	飞鸽/LXJ-VIIB	正常	
照度计	上海精密/ZDS-10W-2D	正常	
光照培养箱	上海博讯/BIC-250	正常	
摇床	叶拓/THZ-250A	正常	
生物显微镜	奥林巴斯/BX53TR	正常	
冷藏冷冻冰柜	西门子/BCD-254	正常	广西壮族自治区生态环境监测中心
便携式多参数测定仪	梅特勒/SevenExcellence	正常	
电子天平	梅特勒/ML204T02	正常	
立式高压蒸汽灭菌器	上海申安/LDZX-75L-I	正常	

仪器名称	厂家型号	性能状况	单位名称
低速离心机	湘仪/L530	正常	广东省科学院微生物研究所(广东省微生物分析检测中心)
生物显微镜	奥林巴斯/GX21FS1	正常	
照度计	上海精密/ZDS-10W-2D	正常	
光照培养室	/	正常	
冷藏冷冻转换柜	雪花/BD/BC-768	正常	
pH 测定仪	WTW/pH3210	正常	
电子天平	梅特勒/XS205DU	正常	
立式高压蒸汽灭菌器	上海申安/LDZM-60L-II	正常	
台式冷冻离心机	热电/ST-16R	正常	
照度计	Gossen/MAVOLUX-5032B	正常	
卧式光照振荡培养箱	上海知楚/ZQWY-200GN	正常	
生物显微镜	奥林巴斯/OLYMPUS-BX53	正常	

附表 3 受试生物信息

受试生物	来源	单位名称
近头状尖胞藻	中国科学院淡水藻种库	生态环境部南京环境科学研究所
近头状尖胞藻	中国科学院淡水藻种库	天津市生态环境监测中心
近头状尖胞藻	中国科学院淡水藻种库	甘肃陇南生态环境监测中心
近头状尖胞藻	中国科学院淡水藻种库	江苏省常州环境监测中心
近头状尖胞藻	中国科学院淡水藻种库	广西壮族自治区生态环境监测中心
近头状尖胞藻	中国科学院淡水藻种库	广东省科学院微生物研究所(广东省微生物分析检测中心)

附表 4 参比物信息

参比物	来源、规格	单位名称
3,5-二氯苯酚	麦克林、纯度 98%	生态环境部南京环境科学研究所
3,5-二氯苯酚	梯希爱、纯度 >98%	天津市生态环境监测中心
3,5-二氯苯酚	麦克林、纯度 98%	甘肃陇南生态环境监测中心
3,5-二氯苯酚	九鼎、纯度 98%	江苏省常州环境监测中心
3,5-二氯苯酚	麦克林、纯度 98%	广西壮族自治区生态环境监测中心
3,5-二氯苯酚	阿拉丁、纯度 >97%	广东省科学院微生物研究所(广东省微生物分析检测中心)

A. 1. 2 方法有效性及敏感性验证

6 家实验室对方法的有效性 & 敏感性进行验证, 使用参比物 3,5-二氯苯酚各分别测定 6 次。整个测试期间, 空白对照组的平均比生长率在 $1.47 \text{ d}^{-1} \sim 1.78 \text{ d}^{-1}$ 之间, 相当于藻类细胞密度增加 81.3 倍~207.5 倍, 符合“空白对照组平均比生长率至少为 1.4 d^{-1} , 相当于在 72 h

试验期内，对照组藻类细胞密度应至少增加 67 倍”的质控要求（见附表 5）。整个测试期间，空白对照组各平行的比生长率变异系数在 0.4%~3.6%之间，符合“整个测试期间，空白对照组各平行的比生长率变异系数≤5%”的质控要求（见附表 6）。测试各阶段（0 d~1 d、1 d~2 d 和 2 d~3 d），空白对照组各平行不同测试阶段的比生长率变异系数的平均值在 7.5%~32.8%之间，符合“各平行的不同阶段比生长率变异系数的平均值≤35%”的质控要求（见附表 7）。整个测试期间，空白对照组相对于培养基的 pH 值升高在 0.12~1.08 之间，符合“相对于藻类培养基，空白对照组 pH 值升高≤1.5 个单位”的质控要求（见附表 7）。反映藻类敏感性的参比物 3,5-二氯苯酚 72 h EC₅₀ 在 2.00 mg/L~3.45 mg/L 之间（见附表 8）。

附表 5 空白对照组整个测试期间各平行的平均比生长率验证结果 (d⁻¹)

实验室 L	试验号 T						范围	结论
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆		
L ₁	1.54	1.54	1.62	1.52	1.55	1.56	1.52~1.62	空白对照组各平行的平均比生长率在 1.47 d ⁻¹ ~1.78 d ⁻¹ 之间，均符合大于 1.4 d ⁻¹ 的质控要求
L ₂	1.57	1.59	1.47	1.56	1.50	1.53	1.47~1.59	
L ₃	1.71	1.69	1.60	1.72	1.67	1.65	1.60~1.72	
L ₄	1.59	1.57	1.61	1.60	1.64	1.58	1.57~1.64	
L ₅	1.76	1.67	1.78	1.77	1.60	1.75	1.60~1.78	
L ₆	1.72	1.58	1.64	1.63	1.61	1.69	1.58~1.72	

附表 6 空白对照组整个测试期间各平行的比生长率变异系数验证结果 (%)

实验室 L	试验号 T						范围	结论
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆		
L ₁	1.90	0.41	2.12	1.06	1.36	1.74	0.41~1.90	空白对照组各平行的比生长率变异系数在 0.4%~3.6% 之间，均满足≤5%的质控要求
L ₂	1.31	2.40	1.16	1.09	0.81	1.86	0.81~2.40	
L ₃	1.73	2.06	0.78	1.42	1.56	1.94	0.78~2.06	
L ₄	2.12	1.66	2.00	1.76	0.82	1.85	0.82~2.12	
L ₅	3.31	2.07	1.58	1.97	2.02	3.60	1.58~3.60	
L ₆	1.69	2.47	0.70	1.07	1.58	1.33	0.70~2.47	

附表 7 空白对照组各平行的不同测试阶段比生长率变异系数的均值验证结果 (%)

实验室 L	试验号 T						范围	结论
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆		
L ₁	26.7	30.4	27.7	21.4	19.3	12.1	12.1~30.4	空白对照组各平行的不同测试阶段比生长率变异系数的均值在 7.5%~32.8% 之间，均符合≤35% 的质控要求
L ₂	24.3	21.1	7.5	21.6	26.5	14.0	7.50~26.5	
L ₃	20.0	22.0	24.6	18.8	21.3	17.4	17.4~24.6	
L ₄	28.1	11.4	25.2	25.6	24.3	32.8	11.4~32.8	
L ₅	19.6	11.9	23.7	14.7	17.1	18.1	11.9~23.7	
L ₆	19.9	27.6	20.0	24.1	25.0	16.2	16.2~27.6	

附表 8 空白对照组相对于藻类培养基 pH 值升高验证结果

实验室 L	试验号 T						范围	结论
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆		
L ₁	0.81	0.77	0.70	0.65	0.58	0.51	0.51~0.81	各实验室空白对照组 pH 值升高在 0.12~1.08 之间, 均满足 ≤1.5 的质控要求
L ₂	0.72	0.67	0.55	0.42	0.32	0.21	0.21~0.72	
L ₃	1.08	1.05	0.98	0.92	0.86	0.80	0.80~1.08	
L ₄	0.65	0.58	0.49	0.40	0.20	0.12	0.12~0.65	
L ₅	1.00	0.92	0.84	0.75	0.62	0.55	0.55~1.00	
L ₆	0.96	0.86	0.78	0.69	0.63	0.56	0.56~0.96	

附表 9 参比物 EC₅₀ 测定验证结果 (mg/L)

实验室 L	指标	试验号 T						72 h EC ₅₀ 范围
		T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	
L ₁	72 h EC ₅₀	2.93	2.00	2.10	2.29	2.64	3.44	2.00~3.45
	95%置信区间	2.51~ 3.56	1.46~ 3.33	1.12~ 3.05	2.03~ 2.66	2.32~ 3.05	2.17~ 5.44	
L ₂	72 h EC ₅₀	2.08	2.41	2.79	2.33	2.57	2.00	
	95%置信区间	2.04~ 2.12	2.35~ 2.47	2.75~ 2.82	2.27~ 2.40	2.53~ 2.61	1.97~ 2.04	
L ₃	72 h EC ₅₀	2.80	2.17	2.23	3.29	2.04	2.27	
	95%置信区间	2.76~ 2.84	2.12~ 2.21	2.20~ 2.27	3.26~ 3.33	2.00~ 2.08	2.23~ 2.31	
L ₄	72 h EC ₅₀	2.16	2.10	2.63	2.68	2.19	2.26	
	95%置信区间	2.10~ 2.21	2.08~ 2.13	2.59~ 2.67	2.56~ 2.80	2.14~ 2.23	2.17~ 2.34	
L ₅	72 h EC ₅₀	2.67	2.50	2.17	3.45	2.15	2.53	
	95%置信区间	2.61~ 2.73	2.47~ 2.53	2.13~ 2.22	3.38~ 3.52	2.08~ 2.22	2.49~ 2.56	
L ₆	72 h EC ₅₀	2.18	3.18	2.19	2.15	2.69	2.43	
	95%置信区间	2.16~ 2.20	3.03~ 3.34	2.15~ 2.23	2.08~ 2.22	2.61~ 2.77	2.41~ 2.46	

A. 1.3 方法精密度

6 家实验室分别对地表水样品测定 6 次, LID 均为 1, 72 h EC₅₀ 均大于 100% (见附表 10)。LID 实验室内相对标准偏差、实验室间相对标准偏差均为 0 (见附表 11)。

附表 10 地表水样品测定结果

实验室 L	测试终点	试验号 T					
		T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆

实验室 L	测试终点	试验号 T					
		T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆
L ₁	LID	1	1	1	1	1	1
	72 h EC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
L ₂	LID	1	1	1	1	1	1
	72 h EC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
L ₃	LID	1	1	1	1	1	1
	72 h EC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
L ₄	LID	1	1	1	1	1	1
	72 h EC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
L ₅	LID	1	1	1	1	1	1
	72 h EC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
L ₆	LID	1	1	1	1	1	1
	72 h EC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%

附表 11 地表水样品 LID 测定精密度验证结果

实验室 L	试验号 T						\bar{X}_i	S_i	RSD _i
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆			
L ₁	1	1	1	1	1	1	1.0	0	0
L ₂	1	1	1	1	1	1	1.0	0	0
L ₃	1	1	1	1	1	1	1.0	0	0
L ₄	1	1	1	1	1	1	1.0	0	0
L ₅	1	1	1	1	1	1	1.0	0	0
L ₆	1	1	1	1	1	1	1.0	0	0
\bar{X}_T	1.0								
S'	0								
RSD'	0								

注： \bar{X}_i 为第*i*个实验室测定结果的平均值； S_i 为第*i*个实验室测定结果的标准偏差；RSD_i为第*i*个实验室测定结果的相对标准偏差； \bar{X}_T 为所有实验室测定结果的平均值； S' 为实验室间标准偏差；RSD'为实验室间相对标准偏差。（下同）

6家实验室分别对地下水样品测定6次，LID为1~2，72 h EC₅₀均大于100%（见附表12）。LID实验室内相对标准偏差分别为0、0、22.3%、22.3%、0、0，实验室间相对标准偏差为13.1%（见附表13）。

附表 12 地下水样品测定结果

实验室 L	测试终点	试验号 T					
		T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆
L ₁	LID	2	2	2	2	2	2
	72 h EC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%

实验室 L	测试终点	试验号 T					
		T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆
L ₂	LID	2	2	2	2	2	2
	72 h EC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
L ₃	LID	2	2	2	1	2	2
	72 h EC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
L ₄	LID	2	2	1	2	2	2
	72 h EC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
L ₅	LID	2	2	2	2	2	2
	72 h EC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
L ₆	LID	2	2	2	2	2	2
	72 h EC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%

表 13 地下水样品 LID 测定精密度验证结果

实验室 L	试验号 T						\bar{X}_i	S _i	RSD _i
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆			
L ₁	2	2	2	2	2	2	2.0	0	0
L ₂	2	2	2	2	2	2	2.0	0	0
L ₃	2	2	2	1	2	2	1.8	0.4	22.3%
L ₄	2	2	1	2	2	2	1.8	0.4	22.3%
L ₅	2	2	2	2	2	2	2.0	0	0
L ₆	2	2	2	2	2	2	2.0	0	0
\bar{X}_T	1.9								
S'	0.3								
RSD'	13.1%								

6 家实验室分别对生活污水样品测定 6 次，LID 为 6~8，实验室内相对标准偏差分别为 14.1%、14.1%、14.1%、14.1%、14.1%、15.6%，实验室间相对标准偏差为 13.4%（见附表 14）。72 h EC₅₀ 在 33.2%~54.0%之间，实验室内相对标准偏差分别为 13.9%、8.0%、15.1%、16.5%、14.9%、16.3%，实验室间相对标准偏差为 16.7%（见附表 15）。

附表 14 生活污水样品 LID 测定精密度验证结果

实验室 L	试验号 T						\bar{X}_i	S _i	RSD _i
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆			
L ₁	8	6	8	6	8	8	7.3	1.0	14.1%
L ₂	8	6	8	8	8	6	7.3	1.0	14.1%
L ₃	6	8	8	8	6	8	7.3	1.0	14.1%

实验室 L	试验号 T						\bar{X}_i	S_i	RSD _i
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆			
L ₄	8	6	6	8	8	8	7.3	1.0	14.1%
L ₅	8	8	6	8	8	6	7.3	1.0	14.1%
L ₆	8	6	8	6	6	8	7.0	1.1	15.6%
\bar{X}_T	7.3								
S'	1.0								
RSD'	13.4%								

附表 15 生活污水样品 EC₅₀ 测定精密度验证结果 (%)

实验室 L	指标	试验号 T						\bar{X}_i	S_i	RSD _i
		T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆			
L ₁	72 h EC ₅₀	46.8	53.9	35.4	47.7	52.0	44.8	46.8	6.5	13.9
	95%置信区间	39.0~ 54.6	45.2~ 62.6	24.0~ 46.8	41.3~ 54.2	38.5~ 65.4	40.0~ 50.0	—	—	—
L ₂	72 h EC ₅₀	51.3	42.4	48.3	50.2	54.0	51.5	49.6	4.0	8.0
	95%置信区间	35.1~ 67.5	37.1~ 47.8	39.8~ 57.0	40.9~ 59.3	38.3~ 69.8	44.3~ 58.6	—	—	—
L ₃	72 h EC ₅₀	48.3	33.7	35.7	36.0	42.2	33.9	38.3	5.8	15.1
	95%置信区间	39.9~ 56.7	22.0~ 45.5	27.0~ 44.4	28.2~ 43.7	35.5~ 49.0	24.5~ 43.3	—	—	—
L ₄	72 h EC ₅₀	46.4	40.9	51.3	33.8	35.3	47.3	42.5	7.0	16.5
	95%置信区间	39.0~ 53.8	35.8~ 46.0	42.1~ 60.4	22.3~ 45.2	27.0~ 43.5	39.3~ 55.3	—	—	—
L ₅	72 h EC ₅₀	33.4	34.6	47.7	34.3	36.1	42.2	38.1	5.7	14.9
	95%置信区间	22.8~ 43.9	23.5~ 45.6	40.9~ 54.4	25.9~ 42.8	26.8~ 45.4	35.9~ 48.6	—	—	—
L ₆	72 h EC ₅₀	33.2	48.0	35.3	47.3	38.9	35.1	39.6	6.5	16.3
	95%置信区间	25.2~ 41.2	41.5~ 54.5	27.6~ 43.0	39.4~ 55.1	33.8~ 44.1	27.6~ 42.6	—	—	—
\bar{X}_T	72 h EC ₅₀	42.5								
S'		7.1								
RSD'		16.7								

6 家实验室分别对工业废水样品测定 6 次，LID 为 24~32，实验室内相对标准偏差分别为 12.9%、0、0、15.5%、12.9%、15.6%，实验室间相对标准偏差为 12.6%（见附表 16）。72 h EC₅₀ 在 4.4%~6.1%之间，实验室内相对标准偏差分别为 8.4%、6.1%、8.1%、8.3%、8.2%、12.4%，实验室间相对标准偏差为 8.5%（见附表 17）。

附表 16 工业废水样品 LID 测定精密度验证结果

实验室 L	试验号 T	\bar{X}_i	S_i	RSD _i
-------	-------	-------------	-------	------------------

	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆			
L ₁	24	24	24	24	24	32	25.3	3.3	12.9%
L ₂	24	24	24	24	24	24	24.0	0	0
L ₃	24	24	24	24	24	24	24.0	0	0
L ₄	24	32	24	24	24	32	26.7	4.1	15.5%
L ₅	24	32	24	24	24	24	25.3	3.3	12.9%
L ₆	32	32	24	24	24	32	28.0	4.4	15.6%
\bar{X}_T	25.6								
S'	3.2								
RSD'	12.6%								

附表 17 工业废水样品 EC₅₀ 测定精密度验证结果 (%)

实验室 L	指标	试验号 T						\bar{X}_i	S _i	RSD _i
		T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆			
L ₁	72 h EC ₅₀	5.36	5.35	5.46	5.18	6.00	4.62	5.33	0.45	8.4
	95%置信区间	5.32~ 5.40	5.31~ 5.39	5.29~ 5.62	5.15~ 5.22	5.96~ 6.03	4.45~ 4.79	—	—	—
L ₂	72 h EC ₅₀	5.08	5.68	5.07	5.10	5.31	5.80	5.34	0.32	6.1
	95%置信区间	5.05~ 5.10	5.64~ 5.71	4.92~ 5.22	5.07~ 5.13	5.25~ 5.38	5.78~ 5.82	—	—	—
L ₃	72 h EC ₅₀	5.59	6.06	5.20	5.50	5.28	4.75	5.40	0.44	8.1
	95%置信区间	5.50~ 5.67	6.02~ 6.10	5.18~ 5.23	5.37~ 5.64	5.24~ 5.32	4.66~ 4.85	—	—	—
L ₄	72 h EC ₅₀	5.75	4.81	5.76	5.12	5.30	4.78	5.25	0.44	8.3
	95%置信区间	5.70~ 5.80	4.70~ 4.92	5.60~ 5.92	5.05~ 5.19	5.26~ 5.35	4.58~ 4.97	—	—	—
L ₅	72 h EC ₅₀	5.55	4.69	5.58	5.68	5.91	5.92	5.55	0.45	8.2
	95%置信区间	5.53~ 5.56	4.65~ 4.73	5.56~ 5.59	5.55~ 5.81	5.80~ 6.03	5.85~ 6.00	—	—	—
L ₆	72 h EC ₅₀	4.53	4.72	5.72	5.85	5.44	4.41	5.11	0.63	12.4
	95%置信区间	4.43~ 4.62	4.60~ 4.84	5.66~ 5.78	5.74~ 5.96	5.30~ 5.57	4.33~ 4.50	—	—	—
\bar{X}_T	72 h EC ₅₀	5.33								
S'		0.45								
RSD'		8.5								

A. 2 方法验证结论

A. 2.1 方法有效性及敏感性

6 家实验室对方法的有效性及其敏感性进行验证，使用参比物 3,5-二氯苯酚各分别测定 6 次。

整个测试期间，空白对照组各平行的平均比生长率在 $1.47 \text{ d}^{-1} \sim 1.78 \text{ d}^{-1}$ 之间，藻类细胞密度增加 81.3 倍~207.5 倍，符合“空白对照组平均比生长率至少为 1.4 d^{-1} ，相当于在 72 h 试验期内，对照组藻类细胞密度应至少增加 67 倍”的质控要求。空白对照组各平行的比生长率变异系数在 0.4%~3.6% 之间，符合“空白对照组各平行间的比生长率变异系数 $\leq 5\%$ ”的质控要求。空白对照组相对于培养基的 pH 值升高在 0.12~1.08 之间，符合“相对于藻类培养基，空白对照组 pH 值升高 ≤ 1.5 个单位”的质控要求。

不同测试阶段（0 d~1 d、1 d~2 d 和 2 d~3 d），空白对照组各平行不同测试阶段的比生长率变异系数的均值在 7.5%~32.8% 之间，符合“各平行的不同阶段比生长率变异系数的平均值 $\leq 35\%$ ”的质控要求。

反映藻类敏感性的参比物 3,5-二氯苯酚 72 h EC_{50} 在 2.00 mg/L~3.45 mg/L 之间。

A. 2. 2 方法精密度

6 家实验室对方法精密度进行验证，使用地表水样品、地下水样品、生活污水样品和工业废水样品各分别测定 6 次：

地表水样品 LID 均为 1，72 h EC_{50} 均大于 100%。LID 实验室内相对标准偏差、实验室间相对标准偏差均为 0。

地下水样品 LID 为 1~2，72 h EC_{50} 均大于 100%。LID 实验室内相对标准偏差分别为 0、0、22.3%、22.3%、0、0，实验室间相对标准偏差为 13.1%。

生活污水样品 LID 为 6~8，实验室内相对标准偏差分别为 14.1%、14.1%、14.1%、14.1%、14.1%、15.6%，实验室间相对标准偏差为 13.4%。72 h EC_{50} 在 33.2%~54.0% 之间，实验室内相对标准偏差分别为 13.9%、8.0%、15.1%、16.5%、14.9%、16.3%，实验室间相对标准偏差为 16.7%。

工业废水样品 LID 为 24~32，实验室内相对标准偏差分别为 12.9%、0、0、15.5%、12.9%、15.6%，实验室间相对标准偏差为 12.6%。72 h EC_{50} 在 4.4%~6.1% 之间，实验室内相对标准偏差分别为 8.4%、6.1%、8.1%、8.3%、8.2%、12.4%，实验室间相对标准偏差为 8.5%。